



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CAPACIDAD DE LAS BACTERIAS DESLIZANTES PARA LA PRODUCCIÓN DE  
BIOETANOL A PARTIR DE COMPUESTOS LIGNOCELULÓSICOS**

***TESIS***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**ADRIAN RAZO MORELOS**



**MÉXICO, D.F.**

**2015**



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:**           **PROFESOR: EDUARDO BONILLA ESPINOSA**  
**VOCAL:**               **PROFESOR: RAQUEL ORTEGA MUÑOZ**  
**SECRETARIO:**       **PROFESOR: LUCIANO HERNANDEZ GOMEZ**  
**1er. SUPLENTE:**     **PROFESOR: JOSE IGNACIO PARAMO RAMIREZ**  
**2° SUPLENTE:**       **PROFESOR: JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR, LABORATORIO ANEXO 1-A, EDIFICIO A.  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA: M. EN C. RAQUEL ORTEGA MUÑOZ** \_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO: DR. JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE** \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE: ADRIAN RAZO MORELOS** \_\_\_\_\_

	Página
1. Resumen	5
2. Generalidades	8
2.1 Residuos lignocelulósicos	8
2.2. Polisacáridos de materiales lignocelulósicos	11
2.2.1. Celulosa	11
2.2.2. Hemicelulosa	11
2.2.3. Lignina	11
2.3. Biocombustibles	11
2.4. Producción de bioetanol	13
2.4.1. Pretratamiento	14
2.4.2. Hidrólisis	14
2.4.2.1. Hidrólisis enzimática	14
2.4.3. Enzimas hidrolíticas de polisacáridos	17
2.4.3.1. Organismos productores de celulasa	17
2.4.3.2. Myxobacterias	17
2.4.4. Fermentación	18
2.4.4.1. Batch	18
2.4.4.2. Hidrólisis y fermentación separadas	19
2.4.4.3. Conversión microbiológica directa	19
2.4.5 Microorganismos fermentadores	19
3. Antecedentes	20
4. Objetivos	22
5. Metodología	24
Diagrama general	25
5.1 Cepas aisladas anteriores a este estudio	26
5.1.1 Medición de actividad celulolítica cualitativa	26
5.2 Determinación tiempo de degradación de lignocelulosa (Método de DNS) a partir de bagazos de papa, pera y manzana	26
5.3 Producción de bioetanol (Método de microdifusión)	27
5.4 Determinación de bioetanol producido a diferentes condiciones	28

de pH	
5.5 Aislamiento de cepas silvestres de <i>S. cerevisiae</i>	28
5.6 Producción de bioetanol por <i>S. cerevisiae</i> como control y cepas silvestres de <i>S. cerevisiae</i> .	28
5.7 Prueba de toxicidad de etanol	29
5.8 Aislamiento y purificación parcial de celulasa	29
5.8.1 Obtención de proteína a partir de los sobrenadantes de los cultivos de las diferentes cepas estudiadas.	29
5.8.2 Determinación de proteína por el método de Lowry	30
5.8.3 Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) Schagger, H. y Von Jagow G.	31
5.8.4 Tinción de geles con azul de Coomassie.	32
5.8.5 Cuantificación de la actividad enzimática exocelulolítica	32
6. Resultados y discusión	34
6.1 Selección e identificación	35
6.2 Medición de actividad celulolítica cualitativa	36
6.3 Determinación de tiempo de degradación de lignocelulosa (Método de DNS) a partir de bagazos de papa, pera y manzana	37
6.4 Determinación de bioetanol producido a diferentes condiciones de pH	40
6.5 Aislamiento de <i>S. cerevisiae</i> y producción de bioetanol	43
6.6 Prueba de toxicidad de etanol	44
6.7 Purificación parcial de celulasa	48
6.8 Efecto de la temperatura de reacción en la actividad de la celulasa.	51
6.9 Efecto del pH de reacción en la actividad de la celulasa.	52
7. Conclusiones	55
8. Perspectivas	57
9. Referencias	59
10. Anexos	65

# Resumen

El incremento de la demanda energética a nivel mundial es una realidad ineludible. Ante esta situación existe una preocupación que está en boga en todo el planeta y es reemplazar el uso de combustibles fósiles por alternativas renovables y sustentables tales como el bioetanol el cuál es el más utilizado a nivel mundial debido a que presenta una gran variedad de opciones para su producción biológica, así como sus aplicaciones, como lo es mezclarlo con gasolina o usarse directamente en motores especializados, siendo una opción de combustible para los autos híbridos (Balat. M., 2011).

En diferentes países del mundo se llevan a cabo una gran cantidad de estudios para desarrollar la producción de alcohol a partir de biomasa lignocelulósica tales como, papel reciclado, residuos de la industria papelera, bagazo de caña, desechos agrícolas (hierba, fruta, etc.) así como residuos sólidos urbanos (Sánchez, C., 2009). El principal reto en la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica es el pretratamiento e hidrólisis de la materia prima. El complejo lignocelulósico está compuesto principalmente de una matriz de carbohidratos de celulosa y lignina enlazada por cadenas de hemicelulosa. Los pretratamientos fisicoquímicos y biológicos ayudan a remover la lignina, hidrolizar la hemicelulosa a azúcares fermentables, y reducir la cristalinidad de la celulosa para liberar la glucosa. (Limayen, A. y Ricke, S. C. 2012). El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de las bacterias deslizantes como posibles productoras de bioetanol, ya que estas juegan un papel importante en la degradación de macromoléculas insolubles, tales como, proteína, celulosa, almidón, peptidoglicanos, lípidos y ácidos nucleicos. Además poseen una gran batería de enzimas hidrolíticas. (E. Whitworth, D. 2011).

El cultivo *in vitro* de estos microorganismos podría servir como una fuente productora de bioetanol, llevando a cabo inicialmente la degradación de los polímeros a través del uso de sustratos complejos con lo cual se permitirá observar su capacidad lignocelulolítica de los polisacáridos presentes en la pared celular vegetal y, posteriormente, determinar si a partir de ellos pueden producir bioetanol.

Las bacterias deslizantes empleadas en este trabajo fueron aisladas previamente en el laboratorio, con base a su capacidad celulolítica. De un total de 20 cepas se seleccionaron 4 por presentar una mayor actividad celulolítica: *Polyangium sp.*, *Myxococcus sp.*, *Melittangium sp.* y *Cytophagales sp.*

Se determinó inicialmente el tiempo en que se produce la máxima cantidad de glucosa libre a partir de la degradación de residuos lignocelulósicos (cáscara de papa, pera y manzana), así como la selección del residuo lignocelulósico donde se obtuvo la mayor cantidad y una vez establecido esto se cuantificó la cantidad de etanol que producen las diferentes cepas aisladas en diferentes condiciones de pH. Al mismo tiempo, se comparó el porcentaje de bioetanol producido con respecto a 2 cepas silvestres de *Saccharomyces cerevisiae*, una aislada a partir de vino artesanal y otra levadura de pan, y se compara con una cepa tipo de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Una vez cuantificada la producción de etanol se comparó con la producción de bioetanol de las cepas aisladas de bacterias deslizantes.

Por último, con el fin de realizar una caracterización inicial de la enzima (celulasa) presente en las diferentes cepas, se realizó una purificación parcial y un análisis electroforético para corroborar el peso molecular y el grado de pureza.

# Generalidades

## 2.1 Residuos lignocelulósicos

La actividad agrícola genera cantidades significativas de desperdicios, que generalmente son utilizados en tierras de cultivo o incineradas para prevenir la propagación de plagas. De igual manera, el sector forestal produce una gran cantidad de desperdicios que provienen de los bosques y del procesamiento de productos de madera. Estos desperdicios pueden ser recolectados y empleados en procesos de bio-refinería. (Garcia, A., *et al.* 2014.)

<b>Desechos</b>	<b>África</b>	<b>Asia</b>	<b>Europa</b>	<b>América</b>	<b>Oceanía</b>
Arroz	20.9	667.6	3.9	37.2	1.7
Trigo	5.34	145.20	132.59	62.64	8.57
Maíz	0.00	33.90	28.61	140.86	0.24
Bagazo	11.73	74.88	0.01	87.62	6.49

Tabla 1. Cantidad de desperdicio agrícola en millones de toneladas, disponible para producción de bioetanol. Tomado y modificado de Sarkar, N., *et al.* 2012.

Los desperdicios agrícolas están mayoritariamente compuestos de material lignocelulósico, el cual representa la fuente renovable más abundante. Esta consiste en 3 tipos de polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, que están fuertemente entrelazados. (Sánchez, C., 2009)

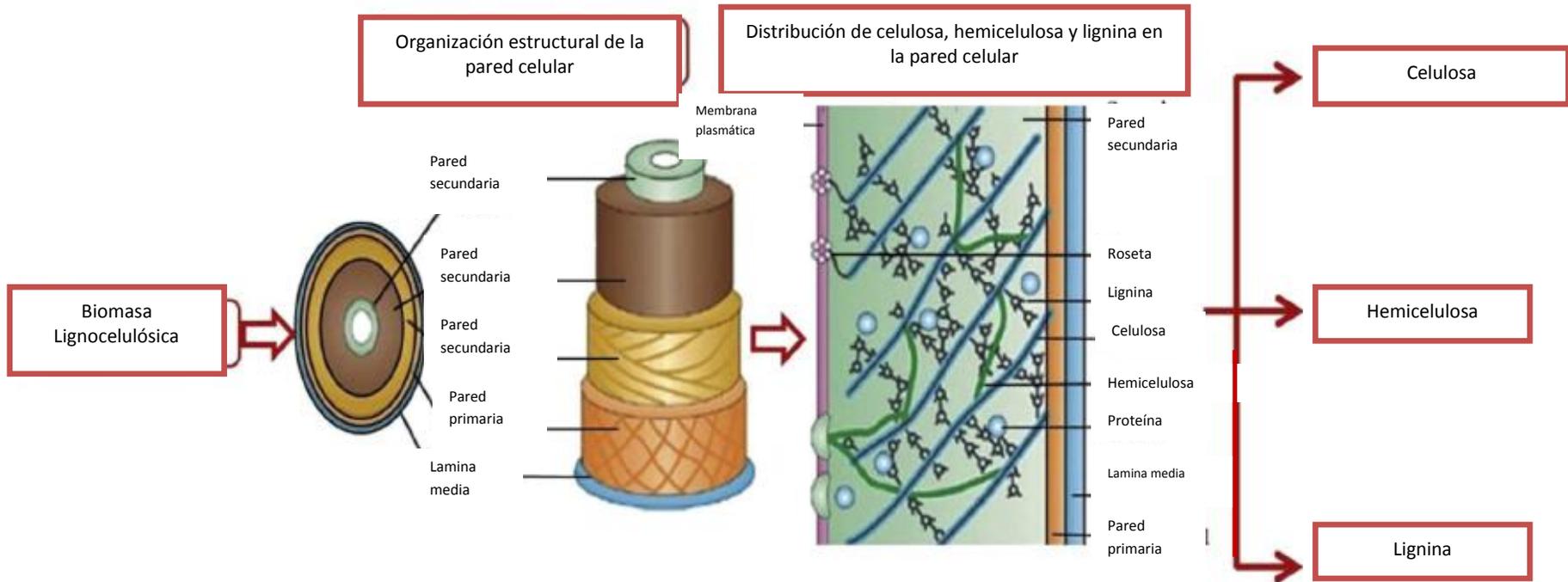


Figura 1. Composición química de los materiales lignocelulósicos. Tomado y modificado de Anwar, Z., *et al.*, 2014

Sin embargo la proporción de estas varía dependiendo la fuente del material lignocelulósico.

<b>Sustrato</b>	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>
Arroz	32-47	19-27	5-24
Trigo	35-45	20-30	8-15
Maíz	42.6	21.3	8.2
Bagazo	65 (carbohidrato total)		18.4

Tabla 2. Composición química de residuos de agricultura. Tomado y modificado de Sarkar, N., *et al.* 2012

## **2.2. Polisacáridos de materiales lignocelulósicos**

### **2.2.1. Celulosa**

Representa 30 – 60% de la masa total seca. Es un polímero lineal de glucosa el cual, debido a su configuración, es difícil de romper. Al proceso de hidrolizar el polisacárido para liberar la glucosa, se le conoce como sacarificación. (Balat. M., 2011).

### **2.2.2. Hemicelulosa**

Representa 20 – 40% de la masa total seca, es un polímero compuesto por pentosas (xilosa y arabinosa) y hexosas (galactosa, glucosa y manosa). Este se encuentra más hidrolizado que la celulosa por su naturaleza amorfa. (Balat. M., 2011).

### **2.2.3. Lignina**

Representa 15 – 25% de la masa total seca, es un polímero aromático que le confiere a la lignocelulosa la resistencia a la degradación química y biológica. (Balat. M., 2011). La lignina es el mayor obstáculo en la conversión eficiente de la lignocelulosa, ya que actúa como barrera física. (Lark, N., *et al.*, 1997)

## **2.3. Biocombustibles**

En la actualidad, el transporte de productos y de personas es totalmente dependiente de petróleo como combustible, y este sector representa el 60% del consumo a nivel mundial (Balat. M., 2011). El aumento diario en el uso de este

combustible para el transporte, el impacto en el medio ambiente, el aumento en el precio del petróleo y su relación con los gases de invernadero, han impulsado la búsqueda y desarrollo de alternativas de combustibles. Una de ellas y la más empleada son los biocombustibles (K. Sukumaran, R. ,2009).

De manera general se le llama biocombustible a aquel combustible producido a partir de materia orgánica (biomasa) y que puede ser utilizado directamente para la combustión, producción de electricidad o como combustible en el sector transportista; algunos ejemplos de estos biocombustibles son el bioetanol, biometanol, aceites vegetales, biodiesel, biogas, bio-aceite, biohidrógeno, entre otros más. (Sarkar, N., *et al.*, 2012).

Los biocombustibles se dividen en dos tipos, biocombustibles líquidos de primera generación, que son aquellos producidos a partir de almidón y cultivos con tecnología convencional; y los biocombustibles líquidos de segunda generación que son aquellos producidos a partir de biomasa lignocelulósica. (Roy, P., *et al.*, 2012) (Coppola, F., *et al.*, 2009).

El bioetanol es el biocombustible más ampliamente utilizado, teniendo su primera aparición a inicios de 1894 en Alemania y Francia siendo utilizado en motores de combustión interna. Sin embargo su potencial como combustible fue ignorado ya que su producción era más costosa que la del petróleo, pero aumentó el interés después de la crisis de combustible en los 70's (Balat. M., 2011).

El bioetanol es el candidato como sustituto de los combustibles fósiles, ya que uno de los principales beneficios de este es que proviene de una fuente renovable (biomasa) y que es un suministro potencial a largo plazo de combustible. Además, puede ayudar a mejorar el empleo rural así como mejorar la economía de este sector. (Mabee, W. E. y Saddler, J. N ,2010).

El bioetanol se obtiene comúnmente de caña de azúcar, trigo, maíz y madera, es decir se produce casi totalmente a partir de cultivos alimentarios; estos se clasifican en 3 categorías de materias primas agrícolas: que contienen sacarosa, almidón y lignocelulósicos. (Balat. M., 2011).

Sin embargo la disponibilidad de las materias primas representa un mayor problema para la producción de bioetanol, por lo que los materiales lignocelulósicos representan una opción económica y de gran abundancia para la producción de bioetanol. Estos materiales lignocelulósicos se pueden clasificar en 4 grupos: residuos forestales, desperdicios sólidos municipales, residuos de papel y residuos de cultivos. (Balat. M., 2011).

De esta manera el factor clave en la eficiencia de la producción de bioetanol es la composición química de los materiales lignocelulósicos; esta varía de acuerdo a factores genéticos y ambientales así como las interacciones entre estos. (Mabee, W. E. y Saddler, J. N, 2010). (Rabelo, S.C., *et al*, 2011).

#### **2.4. Producción de bioetanol**

El proceso de producción de bioetanol consiste de manera general en el pretratamiento, hidrólisis, fermentación y separación del producto o destilación. (Rabelo, S.C., *et al.*, 2011). Sin embargo la producción de bioetanol se ve dificultada durante el proceso de degradación de la lignocelulosa (hidrólisis), esto debido a la resistencia natural de la biomasa a romperse (recalcitrancia), la variedad de azúcares liberados durante el rompimiento de la celulosa y la hemicelulosa. (Balat. M., 2011).

Para la utilización de materiales lignocelulósicos se requiere de la separación de la celulosa y hemicelulosa de la lignina, seguida de la hidrólisis de esta para obtener los azúcares simples que se fermentarán para producir bioetanol. (Sarkar, N., *et al.*, 2012). (Mabee, W. E. y Saddler, J. N, 2010).

Además, otros factores afectan el rendimiento de producción de bioetanol, como son el tipo y grado de pretratamiento del sustrato, el microorganismo fermentador, los nutrientes utilizados y las condiciones de fermentación. (Lever, M., *et al.*, 2010).

### 2.4.1. Pretratamiento

Se requiere hacer un pretratamiento para poder disminuir la recalcitrancia y hacer más accesible la hidrólisis de la lignocelulosa, por lo cual este es el paso de mayor costo en la producción de bioetanol. Este proceso se divide en 3 grandes grupos: procesos físicos, físico-químicos, químicos y biológicos. (Sarkar, N., *et al.*, 2012, Lever, M., *et al.* 2010).

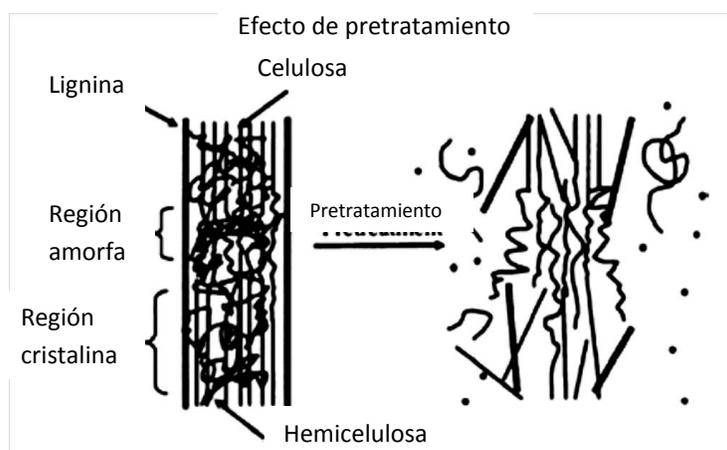


Figura 2. Esquema del efecto del pretratamiento en el material lignocelulósico. Tomado y modificado de Balat. M., 2011.

### 2.4.2. Hidrólisis

Antes de llevarse a cabo la fermentación, los carbohidratos de los materiales lignocelulósicos deben ser convertidos en azúcares simples. Para esto se lleva a cabo el proceso de hidrólisis, en el cual se tiene a disposición diferentes técnicas, las cuales se agrupan en dos grandes grupos: hidrólisis química e hidrólisis enzimática. (Mabee, W. E. y Saddler, J. N., 2010).

#### 2.4.2.1. Hidrólisis enzimática

El proceso de hidrólisis es catalizado por enzimas para la conversión selectiva de celulosa en glucosa, se lleva a cabo en condiciones de temperatura próximas a 28 °C y pH cercanos a 7.0.

### 2.4.3. Enzimas hidrolíticas de polisacáridos

La hidrólisis de materiales lignocelulósicos en azúcares fermentables se lleva a cabo por una enzima llamada celulasa. Esta es generalmente producida por una gran cantidad de microorganismos, bacterias y hongos.

La celulasa comprende a un grupo de enzimas que actúan de manera sinérgica para hidrolizar las uniones  $\beta$ -1,4-D-glucano de la celulosa, consta de endoglucanasas, exoglucanasas o celobiohidrolasas y  $\beta$ -glucosidasas. (Percival Zhang, Y.-H., *et al.*, 2006), las que a su vez existen en una multiplicidad de formas para llevar a cabo la hidrólisis total de la celulosa. De esta manera las endo $\beta$ -1,4-glucanasas (E.C. 3.2.1.4) rompen al azar los enlaces internos de la molécula en las regiones amorfas, producen un rápido decremento en la longitud de la cadena y un lento incremento de los grupos reductores libres. Las exo- $\beta$ -1,4-glucanasas (E.C. 3.2.1.91) remueven unidades de glucosa o celobiosa a partir del extremo libre no reductor de la cadena de celulosa, dando como resultado un incremento rápido en los azúcares o grupos reductores y poco cambio en el tamaño del polímero. Finalmente la  $\beta$ -glucosidasa (E.C. 3.2.1.21) hidroliza celobiosa producida por las actividades anteriores, dando como producto final a la glucosa. (Juturu, V. *et al.*, 2014)

Sin embargo esta enzima presenta limitantes en su uso, ya que disminuye su rendimiento por la presencia de productos inhibidores finales, es decir la glucosa y celobiosa. (Rani Singhania, R., *et al.*, 2010, Mabee, W. E. y Saddler, J. N, 2010, Zhu, Y., *et al.*, 2010). Por un lado, la inducción que se lleva a cabo por sus sustratos naturales celulosa y xilana para las celulasas y xilanasas, respectivamente, y por otro la represión por fuentes de carbono de bajo peso molecular como glucosa y celobiosa para el caso de las celulasas, y xilosa, arabinosa o xilobiosa para las xilanasas. Este modelo sugiere, además, la existencia de un nivel basal de enzimas; aquí el microorganismo sintetiza y exporta a la superficie celular pequeñas cantidades de enzimas, que inician la hidrólisis del sustrato y producen pequeños oligosacáridos que entran a la célula

siendo los verdaderos inductores que encienden la transcripción de los genes. (Sun, X., *et al.* 2008)

Como resultado de la hidrólisis de materiales lignocelulósicos se obtiene: glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, fucosa y ramanosa, variando las proporciones según la fuente del material lignocelulósico. Estos azúcares pueden ser fermentados utilizando diversos microorganismos. Para la obtención de bioetanol, se utiliza principalmente *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*, siendo el primero el más utilizado debido a la robustez que presenta el proceso de fermentación. (Balat. M., 2011).

La celulasa es la tercera enzima industrial a nivel mundial debido a sus diversas aplicaciones como: procesamiento del algodón, reciclaje de papel, extracción de jugo, como enzima detergente y como aditivo de comida para animales, sin embargo su mayor uso se encuentra en la producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos. (Rani Singhania, R., *et al.*, 2010, Saravanakumar, K., *et al.*, 2013).

El costo de la celulasa requerida para la hidrólisis enzimática es significativamente afectado por el precio de los productos derivados de la biomasa celulósica, por lo que el reciclaje de esta enzima se ha vuelto clave en el desarrollo de un proceso a menor costo. Otras causas de su alto costo es que la celulasa libre posee una actividad específica baja, es susceptible a la inactivación y es difícil de reciclarse. (Nanaka, H., *et al.*, 2013, Baek, S., *et al.*, 2012).

La inhibición de este complejo enzimático es causado, como se menciono anteriormente, por el producto y substrato mismos, por efectos de tamaño de partícula, por su unión a lignina (cerca del 40% de la celulasa) (Rodriguez, A. C., *et al.* 2012) y finalmente por los fenoles, que son producidos por algunas plantas como medio de defensa. Los tipos y cantidades de inhibidores varían según la composición de la biomasa, el tipo de pretratamiento y las condiciones a las que se lleva a cabo el proceso. (Ximenes, E., *et al.*, 2010).

Sin embargo, también se cuenta con otro grupo de enzimas hidrolíticas de polisacáridos, las pectinasas. Dependiendo de su especificidad y el tipo de reacción que catalizan, las pectinasas se clasifican en pectina esterasas, poligalacturonasas y pectina liasas. Las pectina esterasas (EC 3.1.1.11) catalizan la desesterificación de la pectina en ácido péctico y metanol. Las poligalacturonasas (EC 3.2.1.15) y las pectina liasas (EC 4.2.2.10) catalizan el rompimiento del enlace glicosídico por hidrólisis y transeeliminación respectivamente, generando mono y oligómeros de pectina como producto (Singh Jayani, R. *et al.*, 2005, Juturu, V. *et al.*, 2014).

#### **2.4.3.1. Organismos productores de celulasa**

La mayoría de las celulasas empleadas en la industria son obtenidas principalmente de hongos filamentosos como: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Phanerochaete*, *Aspergillus*, y también se ha reportado algunas cepas de mixobacterias capaces de producir esta celulasa. (Rani Singhania, R., *et al.*, 2010, Mabee, W. E. y Saddler, J. N. 2010)

#### **2.4.3.2. Myxobacterias**

Son organismos comunes que se pueden encontrar en una gran cantidad de hábitats, como son: suelo, madera podrida, material vegetal en descomposición y estiércol de animales herbívoros. (J. Weissman, K. y Müller, R. 2009).



Figura 3. Cuerpo fructífero de mixobacterias. (Dawid, W. 2000)

Son llamadas bacterias deslizantes, puesto que presenta una movilidad mediante deslizamiento, estos organismos se encuentran clasificados en 3 grandes grupos: citofagas, lisobacterias y mixobacterias (Reichenbach, H. y Höfle, G., 1993). Esta caracterización es debido a su capacidad de degradar biomacromoléculas (E. Whitworth, D. 2011), dentro de las mixobacterias se pueden distinguir dos grupos, las bacteriolíticas, que lisan células vivas de otros microorganismos y las celulolíticas, que son capaces de lisar la celulosa, (E. Whitworth, D. 2011).

La mayoría de los metabolitos secundarios de las mixobacterias presenta actividad contra hongos y otras bacterias debido a la competencia a la que está sometida constantemente con otros degradadores de materiales orgánicos. (E. Whitworth, D. 2011).

La morfología de las mixobacterias es muy variada, principalmente en sus cuerpos fructíferos, siendo esta la principal forma de identificación de las mixobacterias; se ha reportado que las células vegetativas o mixoesporas presentan formas cilíndricas, barras o de extremos redondeados, estas mixoesporas se encuentran incrustadas en esporangiolos que también presentan una conformación esférica y poliédrica. Los cuerpos fructíferos presentan además diferencias tanto de morfología, distribución de cuerpos fructíferos, hasta en color, que pueden variar desde amarillo, naranja, marrón, rojo, café y negro. (Yan, Z., *et al.*, 2003)

#### **2.4.4. Fermentación**

Para llevar a cabo la fermentación se tienen diversas técnicas, como por ejemplo; batch. La selección de la técnica a utilizar depende de las propiedades del microorganismo y el proceso de hidrólisis que se llevara a cabo. (Balat. M., 2011).

##### **2.4.4.1. Batch**

Consiste en un sistema de cultivo cerrado el cual contiene una cantidad limitada de nutrientes, es inoculado con el microorganismo que llevara a cabo la fermentación y durante el proceso no se adiciona nada excepto ácido o sustancias alcalinas para controlar el pH. (Balat. M., 2011).

Además, también se cuenta con distintas estrategias como son: hidrólisis y fermentación separadas, sacarificación y fermentación simultáneas y finalmente conversión microbiológica directa. (Sarkar, N., *et al.* 2012)

#### **2.4.4.2. Hidrólisis y fermentación separadas**

Consiste en llevar a cabo la hidrólisis por separado de la fermentación, generalmente en reactores separados. Este método permite llevar a cabo cada etapa con sus respectivas condiciones óptimas sin afectar el otro proceso. (Balat, M., 2011). (Sarkar, N., *et al.* 2012).

#### **2.4.4.3. Conversión microbiológica directa**

Esta estrategia combina la producción de la celulasa, la hidrólisis de celulosa y la fermentación de glucosa en un solo paso, con lo cual se obtiene un proceso más simple y con menor número de reactores. Sin embargo, presenta bajos rendimientos de producción de bioetanol y generalmente se tiene una baja tolerancia al etanol por parte de los microorganismos (3.5% p/v). (Balat, M., 2011)

#### **2.4.5 Microorganismos fermentadores**

El microorganismo más empleado para llevar a cabo la fermentación es *Saccharomyces cerevisiae*, por su gran capacidad fermentativa, aunque también se ha reportado la utilización de *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Pachysolan tannophilus*, *P. salicaria* y *Zymomonas mobilis*. (Saravanakumar, K., *et al.*, 2013).

# Antecedentes

En el laboratorio donde se realizó el estudio de esta tesis (Laboratorio de Microbiología Molecular) entre los años 2012-2013, se llevo a cabo el estudio de las bacterias deslizantes.

En el primer estudio (Orozco C., K. I., 2007), se realizó la selección e identificación de las bacterias celulolíticas.

En el segundo estudio (Chirinos R., S. L. 2008), se realizó la medición de la capacidad celulolítica y pectinolítica de estas bacterias, así como las condiciones de crecimiento de estas.

En el tercer estudio (Godínez A., P. 2011), se determinó si las bacterias deslizantes aisladas previamente poseen la capacidad de producir bioetanol a partir de la hidrólisis de carbohidratos poliméricos.

En estos estudios se ha basado este trabajo experimental, ya que a partir de la identificación y selección de las cepas de mixobacterias con capacidad celulolítica y pectinolítica, con la posterior determinación de capacidad de producción de bioetanol, se parte de la idea de que estas bacterias son capaces de hidrolizar carbohidratos poliméricos y posteriormente realizar la fermentación alcohólica. En este trabajo se busca determinar las condiciones adecuadas para obtener un mayor rendimiento en la producción de bioetanol a partir de la hidrólisis de carbohidratos poliméricos.

# Objetivos

## **Objetivo general**

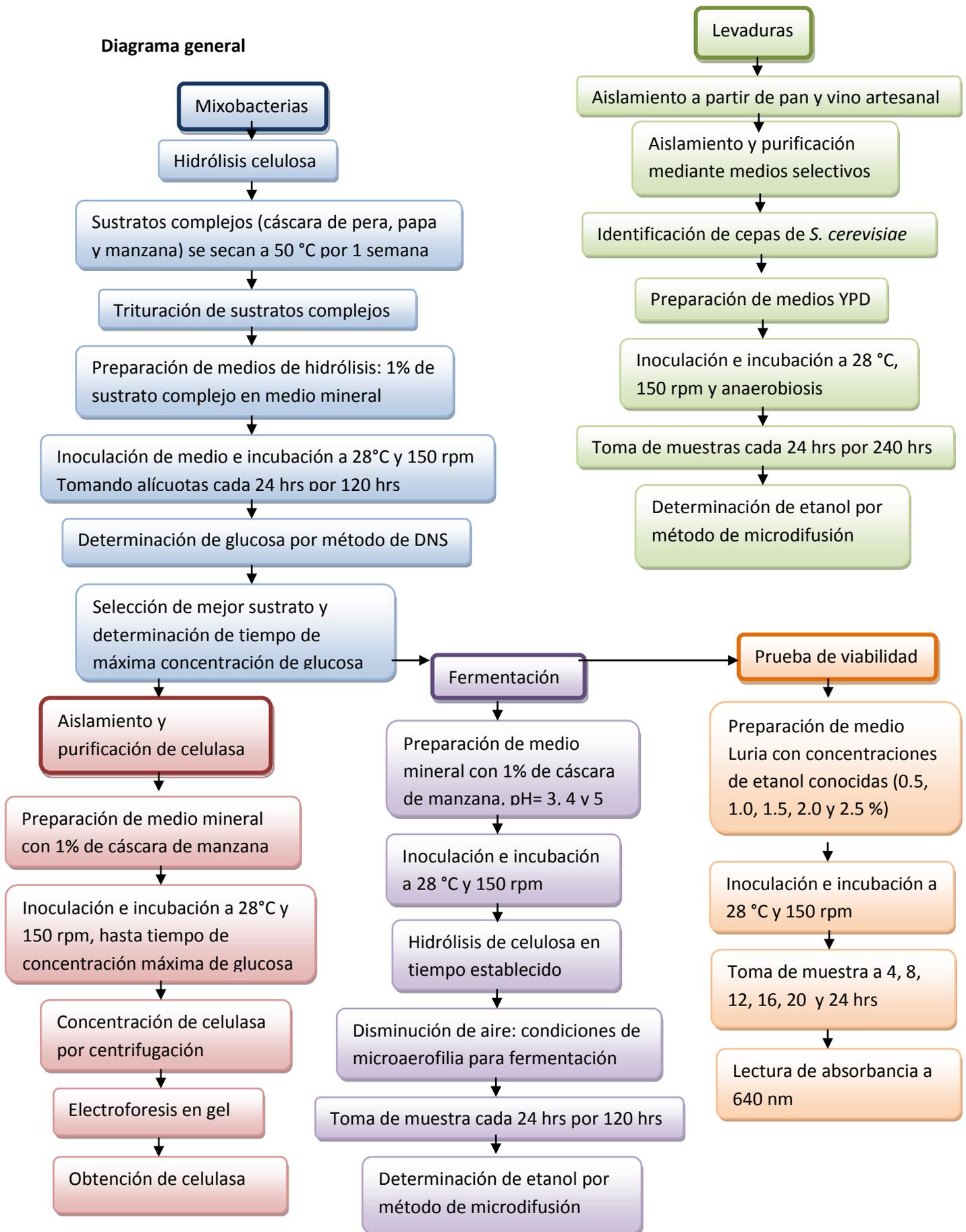
- Determinar si las bacterias deslizantes son capaces de producir bioetanol a partir de bagazo de papa, pera o manzana, en una cantidad semejante o mayor a la cantidad producida por *S. cerevisiae*.

## **Objetivos particulares**

- De acuerdo a la capacidad celulolítica y pectinolítica de las bacterias aisladas previamente, seleccionar a las cepas con mayor capacidad.
- Determinar si las bacterias deslizantes son capaces de producir bioetanol a partir de sustratos complejos.
- Cuantificar la producción de bioetanol por el método de difusión
- Aislar cepas silvestres de levaduras a partir de levadura de pan y de vino artesanal para comparar la producción de bioetanol
- Cuantificar y comparar la producción de bioetanol de las diferentes levaduras aisladas y de la bacterias citofagas con una cepa de *Sacharomyces cerevisiae* ATTC 9763
- Realizar la prueba de viabilidad de las mixobacterias con respecto al etanol
- Aislar y purificar parcialmente a la celulasa producida por las mixobacterias

# Metodología

## Diagrama general



## **5.1 Cepas aisladas anteriores a este estudio**

El muestreo para aislamiento de mixobacterias se realizó a partir de muestras de tierra proveniente del Distrito Federal (Bosque de Tlapan, Xochimilco, Mixquic, Topilejo, Axapusco, Xometla, Ajusco y Acolman) y de locaciones fuera de la Ciudad (Cuernavaca, Puebla, Michoacán, Toluca, etc.).

### **5.1.1 Medición de actividad celulolítica cualitativa**

Se sembraron por duplicado cada una de las cepas aisladas en placas de carboximetil celulosa (CMC) 5 g/L a 32 °C, una cantidad de  $10^7$  células. Una vez obtenidas colonias se les adiciona a las placas una solución acuosa de rojo congo 1 g/L y se dejó reposar 15 minutos. Después de transcurrido este tiempo se retira la solución y se añade NaCl 1 M y se deja por 15 minutos. Finalmente se lavan las placas con agua destilada y la presencia de zonas de degradación alrededor de las colonias son indicativas de que estas son capaces de degradar CMC.

## **5.2 Determinación de tiempo de degradación de lignocelulosa (Método de DNS) a partir de bagazos de papa, pera y manzana**

Se utilizaron cáscaras de pera, papa y manzana previamente lavadas. Se colocaron en una estufa a 50° C por 1 semana. Transcurrido este tiempo se trituraron con ayuda de una licuadora hasta obtener polvo.

Para determinar esta prueba se utiliza medio mineral con 1% del sustrato complejo (manzana, pera, papa), con un inóculo inicial de  $1 \times 10^5$  cel/mL de las cepas: *Melittangium sp.*, *Cytophagales sp.*, *Myxococcus sp.* y *Polyangium sp.* con una agitación constante de 150 rpm y una temperatura de 28°C

De los cultivos descritos anteriormente se toma una alícuota de 0.5 mL, cada 24 horas hasta un total de 120 horas y se realiza la cuantificación de azúcares reductores siguiendo el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959)

A la muestra tomada se le agrega 0.5 mL del reactivo de DNS, se calienta a ebullición por 5 minutos utilizando un baño maría, al termino se añaden 5 mL de agua destilada y se deja reposar 10 minutos, se lee la absorbancia de la mezcla de reacción a una  $\lambda=575$  nm. Se cuantificaron los azúcares reductores utilizando dos curvas patrón de glucosa (una curva de 0.1-1 mg/mL y otra de 1-9 mg/mL).

### **5.3 Producción de bioetanol (Método de microdifusión)**

Para determinar la cantidad de bioetanol producido se realiza la cuantificación por el método descrito por Rodríguez Aliaga (2010).

Este método se basa en que si una sustancia volátil (en este caso etanol) y un solvente puro están en contacto con la misma atmósfera pero en compartimientos separados, la sustancia volátil tenderá a disolverse en el solvente puro, pero si este solvente puro convierte la sustancia volátil en no volátil, la difusión se llevara a cabo hasta que la presión de vapor en la atmósfera compartida tienda a cero. (Rodríguez, A. C., 2012)

El ensayo se realiza colocando un tubo de ensaye dentro de otro (cámara de Conway), en el tubo exterior se colocan 0.5 mL de solución saturada de carbonato de potasio; mientras que en el tubo interno se adiciona 1.0 mL de una solución de dicromato de potasio al 0.145% en ácido sulfúrico 10 N. En el compartimiento exterior se agrega 0.1 mL de muestra y se tapa el tubo exterior. Este dispositivo se incuba en baño María a 45°C por 60 minutos, al término de este periodo se le agrega 0.5 mL de agua destilada y se mide la absorbancia a una  $\lambda= 450$  nm. Se cuantificó la cantidad de bioetanol mediante dos curvas patrón de etanol (una curva de 0.05-1.8 % etanol y otra de 2-10 % etanol).

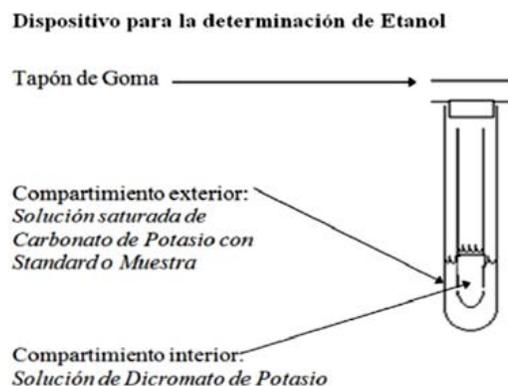


Figura 4. Esquema de cámara de Conway. Tomado de Rodríguez Aliaga. 2010

#### 5.4 Determinación de bioetanol producido a diferentes condiciones de pH

Para determinar la cantidad de bioetanol producido a diferentes condiciones de pH, se utiliza medio mineral con 1% del sustrato complejo (manzana), modificando el pH con ácido o base según el caso, para obtener medios de un pH de 3, 4 y 5. Estos medios se inocularon con una cantidad inicial de  $1 \times 10^5$  cel/mL de las cepas: *Melittangium sp.*, *Cytophagales sp.*, *Myxococcus sp.* y *Polyangium sp.* con una agitación constante de 150 rpm y una temperatura de 28°C. Se incuban hasta el tiempo de producción máxima de glucosa (establecido anteriormente en 100 hrs) para posteriormente colocar los matracos en condiciones de microaerofilia y así comenzar la fermentación. Se toma una alícuota cada 24 horas por 120 horas y se les determina la cantidad de bioetanol producido por la técnica de microdifusión.

#### 5.5 Aislamiento de cepas silvestres de *S. cerevisiae*

Se tomaron muestras de pan artesanal y vino blanco espumoso artesanal de la Redonda, Querétaro. Estas muestras fueron colocadas en medio YPG, para el aislamiento y purificación de las cepas, se determinó la cepa mediante las características macro y microscópicas.

#### 5.6 Producción de bioetanol por *S. cerevisiae* como control y cepas silvestres de *S. cerevisiae*.

Para determinar la cantidad de bioetanol producido por *S. cerevisiae*, se utiliza medio líquido de extracto de levadura, peptona de caseína y glucosa (medio YPD).

Estos medios se inocularon con una cantidad inicial de  $1 \times 10^5$  cel/mL de las cepas ATCC 9763 y las 2 cepas silvestres aisladas (Ap y Av). Con una agitación constante de 150 rpm, una temperatura de 28°C y en condición de anaerobiosis, se tomaron alícuotas cada 24 horas por 240 horas, determinándoles el bioetanol producido por la técnica de microdifusión.

### **5.7 Prueba de toxicidad de etanol**

Esta prueba consiste en determinar si el bioetanol producido por las bacterias deslizantes les resulta tóxico. Para esto se prueban el efecto de una concentración conocida de etanol (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 % de etanol) en un cultivo en fase logarítmica de estas bacterias en caldo Luria, incubando con agitación constante y tomando una alícuota a los 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas. De la alícuota tomada se hace la medición de la absorbancia a 640 nm.

### **5.8 Aislamiento y purificación parcial de celulasa**

Para aislar a la celulasa, se utilizó medio mineral con 1% del sustrato complejo (manzana). Estos medios se inocularon con una cantidad inicial de  $1 \times 10^5$  cel/mL de las cepas: *Melittangium sp.*, *Myxococcus sp.* y *Polyangium sp.* con una agitación constante de 150 rpm y una temperatura de 28°C. Se incuban hasta el tiempo de producción máxima de glucosa para posteriormente concentrar la celulasa por medio de centrifugación.

#### **5.8.1 Obtención de proteína a partir de los sobrenadantes de los cultivos de las diferentes cepas estudiadas.**

Una asada del stock bacteriano se sembró en un tubo con 5 mL de medio; el pre-cultivo se incubó durante 24 horas a 28°C con agitación constante a 160 rpm. Transcurrido éste tiempo, 2 tubos de pre-cultivo fueron transferidos a un matraz de 50 mL de medio LB y se incubaron a 28°C a 160 rpm durante 24 horas.

Posterior a este tiempo los cultivos finales fueron centrifugados a 10,000 rpm durante 15 minutos (con el rotor RC-5B de Sorvall). Al término del tiempo se recuperó el sobrenadante y se conservó en hielo.

Los sobrenadantes de cada cepa se concentraron hasta el mínimo volumen posible utilizando filtros Millipore Amicon de poro de 3,10, 30, y 100 KDa. Los sobrenadantes se centrifugaron durante 15 minutos a 4,500 rpm a 4 °C en una centrifuga clínica. Posteriormente la fracción fue colectada y se volvió a centrifugar a 4,500 rpm durante 15 min pero ahora empleando otro filtro Amicon de poro diferente. En el sobrenadante se tenía la proteína concentrada la cual se guardó a -70 °C adicionándole 10% de glicerol y 2X de inhibidores de proteasa (complete EDTA free de Roche).

La mezcla se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min y el sobrenadante fue recuperado; a éste se le adicionó 10 mM de EDTA y se realizó una precipitación con sulfato de amonio al 50 %f a 4 °C durante 20 minutos, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min y el sobrenadante se precipitó nuevamente con sulfato de amonio 30% para alcanzar una concentración de 80 %f. La mezcla fue centrifugada a 14,000 rpm durante 10min y la pastilla de proteína fue resuspendida en amortiguador B.

### **5.8.2 Determinación de proteína por el método de Lowry**

Las muestras a determinar y los estándares 2.5, 5, 10, 20, 30 y 40 µg de albúmina se aforaron a 100 µL con H<sub>2</sub>O Milli Q, se agregó 1mL de una mezcla 50:1 de la solución A (2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 0.1N de NaOH) y solución B (1 % CuSO<sub>4</sub>, 2 % tartrato Na-K en 0.1 N de NaOH); y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente; se adicionó 100 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma) diluido 1:1 con H<sub>2</sub>O, incubando a temperatura ambiente por 20 minutos. Finalmente se cuantificó la absorbancia de la curva estándar y de las muestras a una longitud de onda de 660 nm y se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras con respecto a los de la curva para obtener su concentración.

Algunas muestras se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) antes de la determinación de proteína con el fin de evitar la interferencia de algunos componentes del medio. Para esto tanto la curva estándar como las muestras problema fueron aforadas a 1 mL con H<sub>2</sub>O y a éstas se les agregó 100 µL de desoxicolato de sodio al 0.15 % incubando por 10 min a temperatura ambiente. La precipitación de la proteína se realizó agregando 100 µL de TCA 72 % e incubando 15 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos, descartando el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla de proteína en 100 µL de H<sub>2</sub>O con 2.5 µL de NaOH 2.5 M, finalmente se agregó 1 mL de mezcla A+B y se continuó con el protocolo de Lowry.

### **5.8.3 Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) Schagger, H. y Von Jagow G.**

Este tipo de electroforesis es muy eficiente en la resolución de proteínas de mediano (100 KDa) a bajo peso molecular (10 KDa). Las proteínas utilizadas durante el proyecto se encuentran en peso en este rango, por lo que decidimos que ésta técnica nos brindaría certidumbre en la definición de estas proteínas.

Se realizaron mini-geles de 0.75 mm y 1 mm de grosor que estaban compuestos por una porción separadora de aproximadamente 5.5 cm de 12.5 % de una mezcla de acrilamida y bis-acrilamida (30 %: 2.6 %) y una porción concentradora de aproximadamente 1.2 cm con 4 % de acrilamida/bis, ambas porciones se prepararon en el amortiguador del gel (Tris 1 M y SDS 0.1 % pH 8.45).

Todas las muestras se centrifugaron 15 minutos a 18000 xg y temperatura de 4 °C. En cada carril se colocó una cantidad de proteínas correspondiente a 20-30 µg. Por otra parte las muestras se diluyeron 1:1 en el amortiguador de muestra (12.5 % de amortiguador del gel, 1% SDS, 15% glicerol, 0.5% azul de bromofenol y 10 mM de DTT) y se calentaron durante 5 min a 95°C previo a ser cargadas en el gel.

Estas electroforesis se realizaron en cámaras mini-Protean Tetra cell de Biorad, usando el amortiguador de corrida para cátodo (Tris 0.1 M, Tricina 0.1 M y SDS 0.1% pH 8.25) y amortiguador de ánodo (Tris-HCl 0.2 M pH 8.93); los geles se corrieron a 100 V hasta que el frente de corrida alcanzó la porción separadora y posteriormente se aumento a 120 V durante aproximadamente 1 hora y media.

#### **5.8.4 Tinción de geles con azul de Coomassie.**

Los geles resultantes de las electroforesis de proteína fueron teñidos alrededor de media hora usando una solución al 0.2% de colorante azul de Coomassie R250 (Research Organics) con 47% de etanol y 10% de ácido acético, tras lo cual fueron desteñidos incubando con una solución de 50% metanol y 7.5% ácido acético hasta obtener el contraste deseado

Los geles obtenidos se fijaron y colorearon simultáneamente (12 horas) con una solución de metanol, ácido acético y agua (5:5:2) conteniendo 0.1% de Coomasie Brilliant Blue R-250 (Anedra, Argentina). Para estimar la masa molecular de las proteínas, se separaron también en los geles patrones de diferente peso molecular (SIGMA), conteniendo  $\alpha$ -lactoalbúmina (14.4 kDa); inhibidor de tripsina (20.1 kDa); anhidrasa carbónica (30 kDa); ovoalbúmina (43 kDa); seroalbúmina bovina (67 kDa) y fosforilasa b (94 kDa).

Se tomaron imágenes de los geles y se analizaron.

#### **5.8.5 Cuantificación de la actividad enzimática exocelulolítica**

Para determinar la actividad exocelulolítica se realizó la cuantificación de azúcares reductores pro el método de DNS. Se inocularon  $1 \times 10^5$  cel/mL de cada una de las cepas en matraces Erlenmeyer con 25 mL de carboximetil celulosa (CMC) 1 % p/v con agitación constante de 200 rpm, variando las condiciones de temperatura (25, 27, 29, 31, 33 y 35 °C) y pH (3, 4 y 5) para determinar el comportamiento de la celulasa frente a estas condiciones.

Para determinar el efecto de la temperatura en la actividad de exocelulolítica se tomó una alícuota de 0.5 mL a los 40 min y se determinan los azúcares reductores por el método de DNS descrita en el punto 5.2

Para determinar el efecto del pH en la actividad de exocelulolítica se tomó una alícuota de 0.5 mL cada 4 horas hasta un total de 24 horas y se determinan los azúcares reductores por el método de DNS descrita en el punto 5.2

# **Resultados Y Discusión**

## 6.1 Selección e identificación

Del total de muestras se logró aislar 45 % de mixobacterias, a las que se les determinó su capacidad pectinolítica y celulolítica, de los cuales solo el 20 % de las cepas totales mostraron actividad celulolítica y pectinolítica, por lo que basados en estos resultados se procedió a probar la actividad celulolítica y pectinolítica en sustratos complejos, así como su capacidad de producir bioetanol

De las cepas aisladas se decidieron utilizar las siguientes cepas debido a que presentaron una mayor actividad celulolítica y pectinolítica de un grupo de mixobacterias con el que se trabajó en una tesis previa a este trabajo.

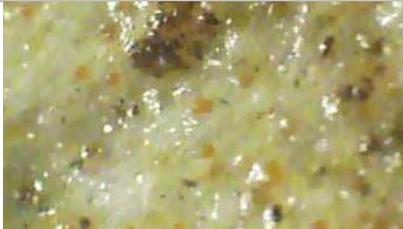
Cepa		Capacidad celulolítica	Capacidad pectinolítica
<i>Polyangium sp.</i>		SI	SI
<i>Myxococcus sp.</i>		SI	SI
<i>Melittangium sp.</i>		SI	SI
<i>Cytophagales sp.</i>		SI	SI
<i>Av (Sacharomyces sp.)</i> aislada de vino artesanal			
<i>Ap (Sacharomyces sp.)</i> aislada de pan artesanal			

Tabla 3. Cepas de mixobacterias y levaduras empleadas.

Posteriormente, se procedió a determinar la cantidad máxima de glucosa liberada a partir de la degradación de materiales lignocelulósicos (bagazo de pera, para y manzana), para así poder establecer la opción más viable para los experimentos posteriores.

## 6.2 Medición de actividad celulolítica cualitativa

Para la identificación de las cepas productoras de celulasa se seleccionaron aquellas que crecieron sobre papel filtro. La actividad celulolítica se determinó creciendo las cepas en medio Luria con carboximetilcelulosa al 0.5 % (p/v). La actividad se identificó en forma visual por la formación de un halo de color amarillo alrededor de la colonia, lo que significa una degradación del sustrato presente en la placa por la enzima liberada por las bacterias al medio.



Figura 5. Ensayo de la actividad celulolítica extracelular por diferentes cepas de citofagas aisladas. Placa en medio Luria con carboximetilcelulosa (CMC) al 0.5 % (p/v).

### 6.3 Determinación de tiempo de degradación de lignocelulosa (Método de DNS) a partir de bagazos de papa, pera y manzana

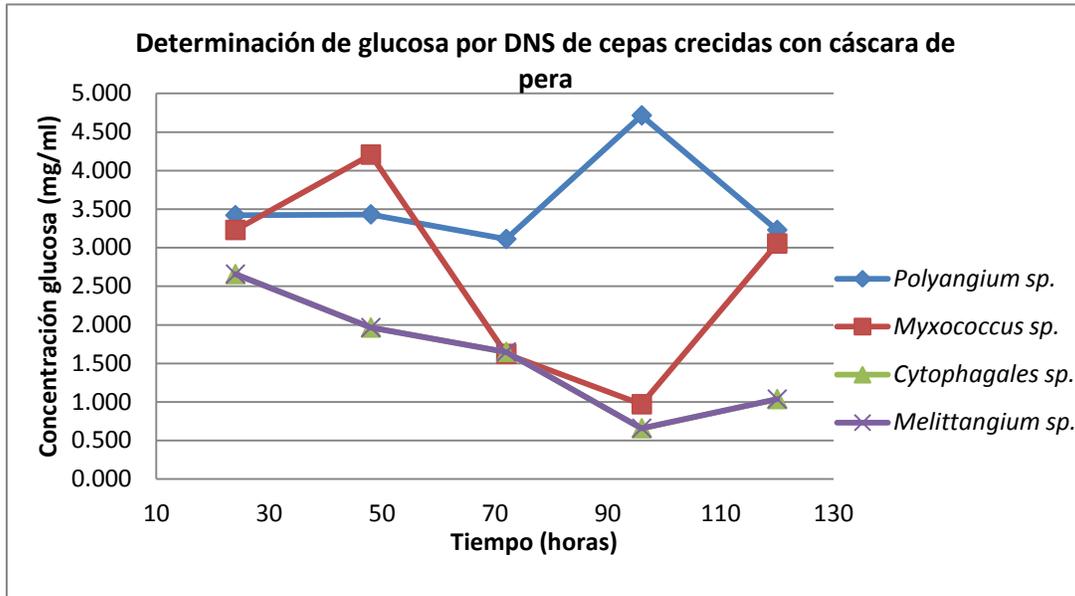
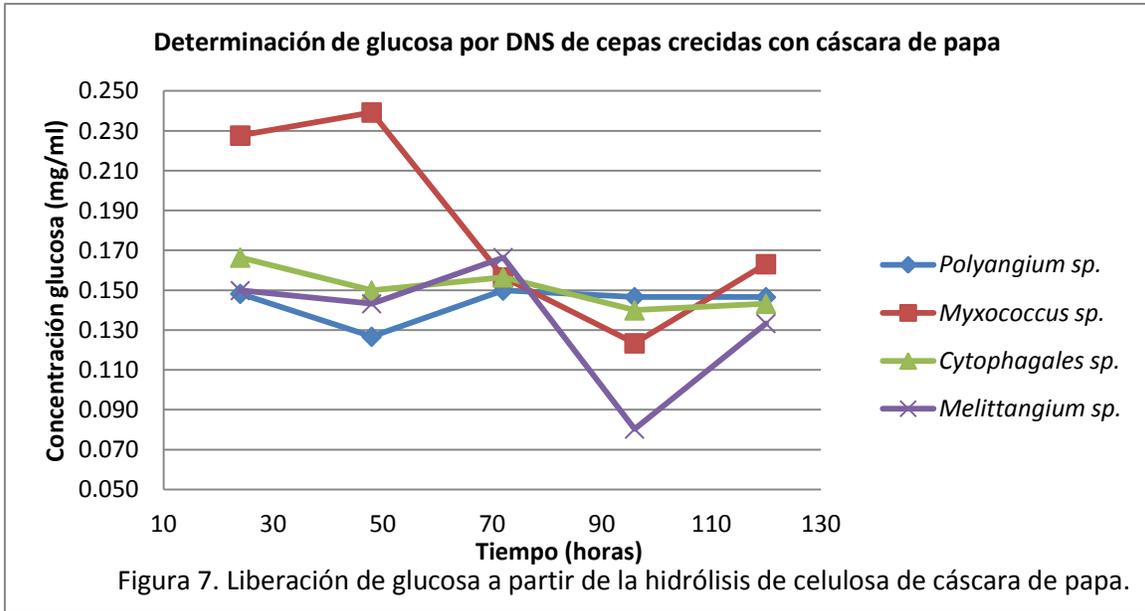


Figura 6. Liberación de glucosa a partir de la hidrólisis de celulosa de cáscara de pera.

Como se puede observar en la figura 6, las cepas *Melittangium sp.* y *Cytophagales sp.* no producen una gran cantidad de glucosa a lo largo del tiempo, incluso disminuye la cantidad de este. Esto puede ser debido a que no son capaces de hidrolizar la celulosa de la manzana y que en su lugar están utilizando la glucosa del medio para llevar a cabo sus procesos metabólicos. *Myxococcus sp.* presenta un incremento en la glucosa que después se ve disminuido drásticamente a lo largo del tiempo para al final volver a incrementar la cantidad de glucosa liberada. Este comportamiento puede deberse a que al inicio degrada celulosa, pero al alcanzar determinada cantidad de glucosa en el medio procede a utilizar este para su metabolismo y finalmente al disminuir mucho al cantidad de glucosa vuelve a realizar la degradación de celulosa. Finalmente *Polyangium sp.* en un inicio puede encontrarse en una fase de adaptación a las condiciones del medio. Después de esto se observa un incremento en la cantidad de glucosa y posteriormente una disminución de esta, pudiendo ser a la utilización de la glucosa que se liberó de la hidrólisis de la celulosa.



Como se puede apreciar en la figura 7 todas las cepas presentan un comportamiento similar, ya que presentan un aumento en la cantidad de glucosa liberada antes de las 70 horas, que después va disminuyendo. Posteriormente se aumenta la concentración de esta en las cepas *Myxococcus sp.* y *Melittangium sp.* mientras en las otras cepas se observa que la cantidad de glucosa se mantiene constante: La baja producción de glucosa mostrada puede atribuirse a las propiedades propias de la papa, ya que al contener una gran cantidad almidón dificulta e interfiere la unión de las enzimas y la celulosa, debido a la configuración y estructura de este.

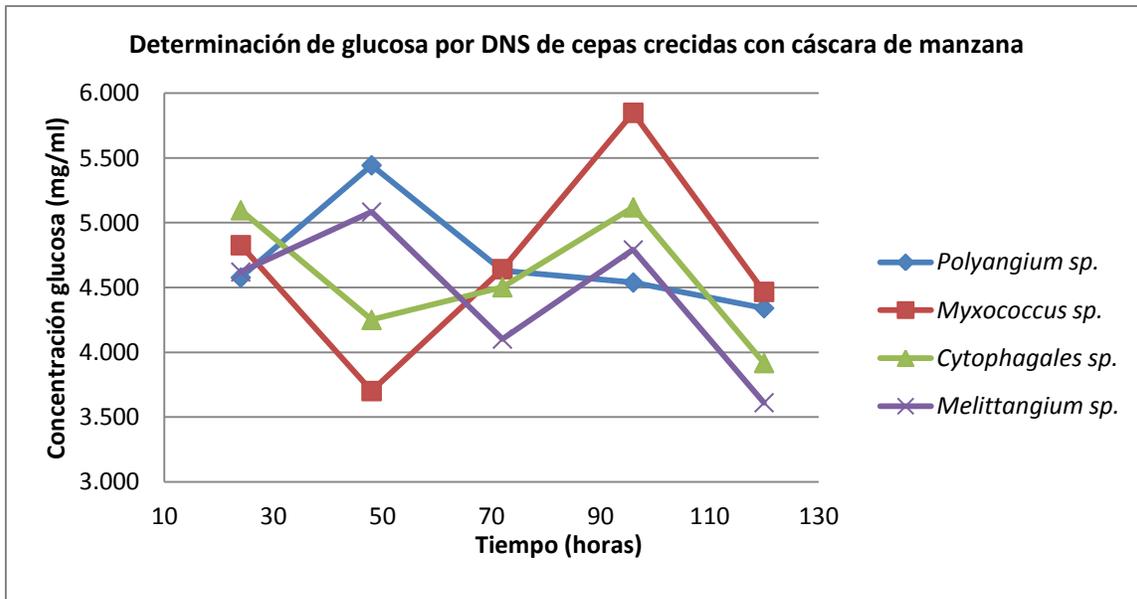


Figura 8. Liberación de glucosa a partir de la hidrólisis de celulosa de cáscara de manzana.

Como se puede apreciar en la figura 8 *Polyangium sp.* y *Melittangium sp.* presentan una mayor cantidad de glucosa liberada a las 50 horas, mientras que *Myxococcus sp.* y *Cytophagales sp.* presenta la máxima cantidad a las 100 horas. La disminución inicial de glucosa puede ser debido a la presencia de glucosa en el medio proveniente de la cáscara de manzana podrían utilizar esta como fuente de energía y al irse agotando iniciar con la hidrólisis de la celulosa, esto mismo puede explicar el comportamiento oscilante de *Melittangium sp.*

La disminución significativa de glucosa puede deberse a la inhibición de la celulasa por la presencia de glucosa, es decir al llegar al máximo de glucosa la presencia de la misma en el medio inhibe la actividad enzimática de la celulasa, dejando así de obtenerse una mayor cantidad; además de que al detectar glucosa en el medio la célula volverá a utilizar ésta como fuente de energía principal, ya que requiere un menor esfuerzo para utilizar la glucosa que la celulosa. (K. Sukurman, R., *et al.* 2009).

Con esto se determinó que el mejor sustrato complejo para llevar a cabo la fermentación es la cáscara de manzana, ya que es el medio en que se obtuvieron las mayores cantidades de glucosa liberada y además todas las cepas

presentaron un comportamiento similar con concentraciones de glucosa similares en el mismo tiempo, es decir 100 horas, estableciendo este tiempo como el requerido para llevar a cabo la hidrólisis de celulosa.

#### 6.4 Determinación de bioetanol producido a diferentes condiciones de pH

Una vez determinados el tiempo de liberación máxima de glucosa en 100 horas y seleccionado el sustrato complejo donde se obtuvieron las mayores cantidades de glucosa (cáscara de manzana), se procedió a llevar a cabo la fermentación alcohólica variando el pH, después de haber transcurrido el tiempo previamente establecido para la hidrólisis de la celulosa, para finalmente establecer en cual valor de pH se obtiene una mayor cantidad de bioetanol.

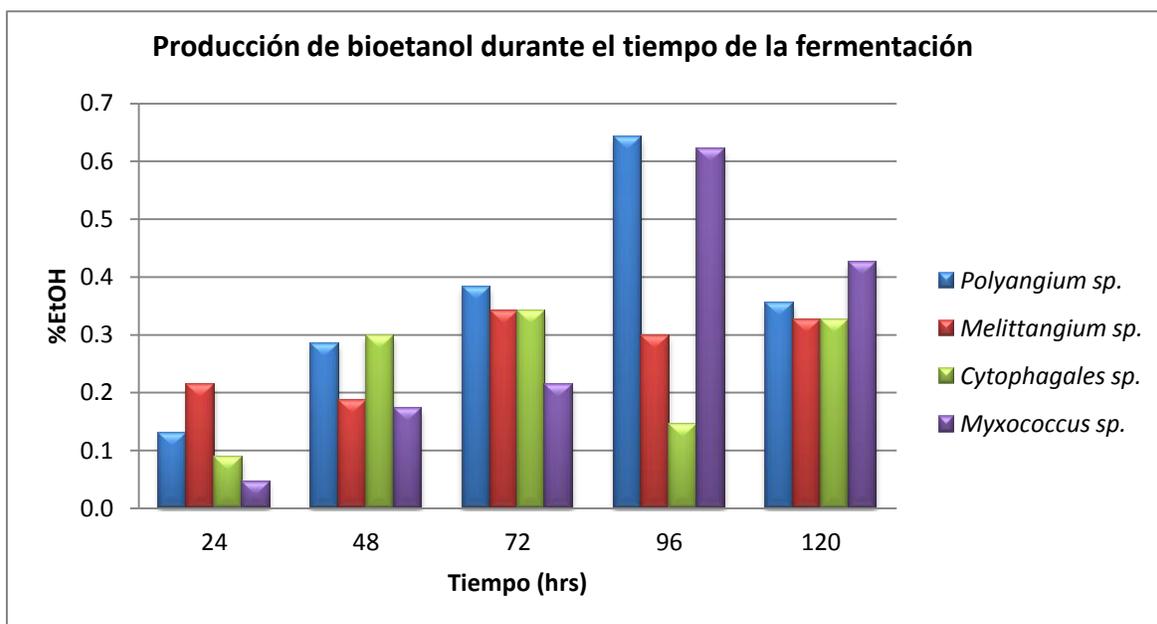


Figura 9. Porcentaje de bioetanol obtenido de la fermentación a partir de la hidrólisis de cáscara de manzana a pH=3

Como se observa en la figura 9 las cepas *Melittangium sp.* y *Cytophagales sp.* producen un máximo de bioetanol a las 72 hrs (0.341 % EtOH), disminuyendo y aumentando de nuevo a las 120 hrs (0.327 % EtOH). Mientras que *Polyangium sp.* y *Myxococcus sp.* tienen una máxima producción de bioetanol a las 96 hrs (0.642 % EtOH y 0.621 % EtOH respectivamente), disminuyendo finalmente a las 120 horas. En todas las cepas se observa una tendencia de campana, es decir va

aumentando la cantidad de bioetanol producido hasta llegar a un máximo y posterior a este, disminuye; esto puede atribuirse a que se va agotando la cantidad de glucosa disponible para llevar a cabo la fermentación.

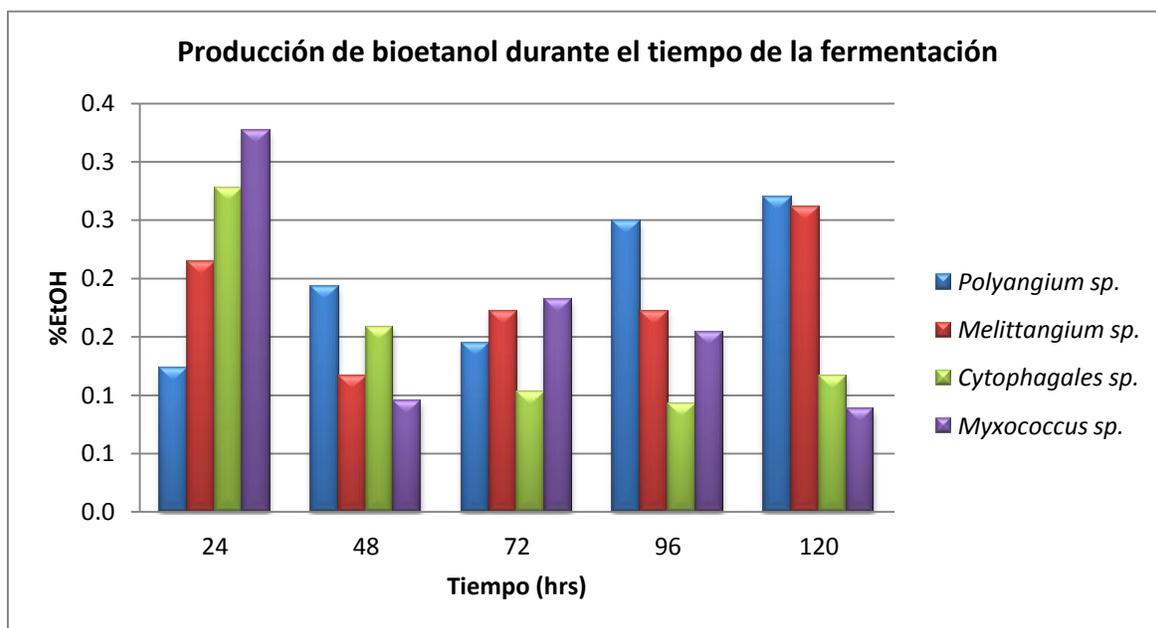


Figura 10. Porcentaje de bioetanol obtenido de la fermentación partir de la hidrólisis de cáscara de manzana a pH=4

Como se observa en la figura 10, las cepas *Myxococcus sp.* y *Cytophagales sp.* presentan un máximo de bioetanol a las 24 hrs (0.327 % EtOH y 0.278 % EtOH, respectivamente), oscilando la cantidad de este en el transcurso del tiempo. Mientras que *Polyangium sp.* y *Melittangium sp.* presentan un máximo a las 120 hrs (0.271% EtOH y 0.261% EtOH, respectivamente), presentado igualmente un comportamiento oscilatorio a lo largo del tiempo. Este comportamiento oscilatorio puede deberse a pérdida de bioetanol al tomar las muestras, debido a su volatilidad, además de que el pH puede haber influido en el comportamiento enzimático y la glucosa disponible para llevar a cabo la fermentación.

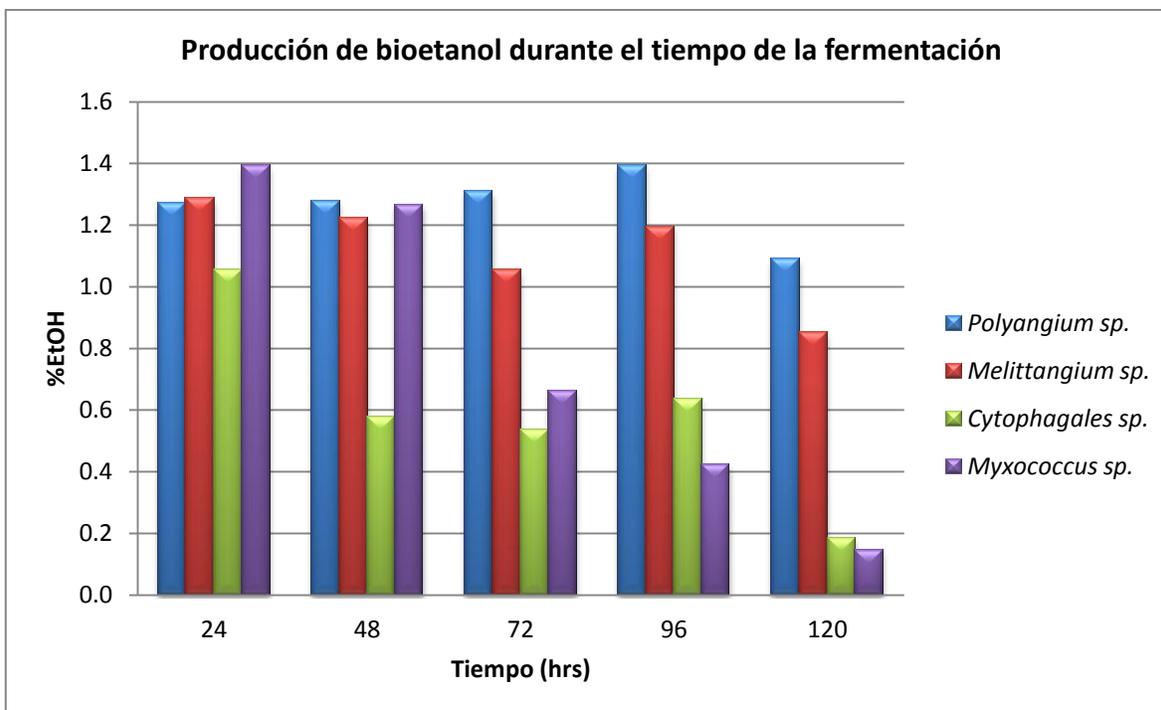


Figura 11. Porcentaje de bioetanol obtenido de la fermentación a partir de la hidrólisis de cáscara de manzana a pH=5

Como se observa en la figura 11 las cepas *Myxococcus sp.*, *Cytophagales sp.* y *Melittangium sp.* presentan un máximo de bioetanol a las 24 hrs (1.393 % EtOH, 1.056 % EtOH y 1.288 % EtOH respectivamente), disminuyendo la cantidad de este en el transcurso del tiempo. Mientras que *Polyangium sp.* presenta un máximo a las 96 hrs (1.393 % EtOH). A lo largo del tiempo se puede observar un descenso uniforme en la cantidad de bioetanol. Sin embargo, se obtuvo una mayor cantidad de bioetanol con respecto a los demás pH. Esto es debido a que a pH más alcalinos las enzimas son más estables y sumado a esto, a este pH las mixobacterias tienen un mayor crecimiento poblacional ya que se encuentran en condiciones óptimas para su desarrollo, lo que propicia una mayor cantidad de alcohol en un menor tiempo.

Analizando todos los datos obtenidos en conjunto podemos sugerir que el pH en el cual se obtiene una mayor cantidad de bioetanol es a pH=5, con una tendencia de todas las cepas de 1.4 % de bioetanol.

De manera general se observa una oscilación en la cantidad de bioetanol obtenido. Esto puede ser debido a diferentes factores, como lo es el metabolismo propio de las mixobacterias ya que pueden ocupar el bioetanol como metabolito para llevar a cabo algún otro proceso bioquímico para sobrevivir a las condiciones cambiantes del medio a lo largo del tiempo, acumulación de algún metabolito que resulte tóxico para la célula, la toxicidad propia del etanol hacia la célula, así como la adaptación a las condiciones cambiantes del medio

### 6.5 Aislamiento de de *S. cerevisiae* y producción de de bioetanol

Adicionalmente a las fermentaciones alcohólicas realizadas con las mixobacterias, se realizó el aislamiento de dos cepas silvestres de levaduras para utilizarse como medida de comparación de producción de bioetanol, y se utilizó además una cepa tipo de *Sacharomyces cerevisiae* ATTC 9763; la medida de comparación de las mixobacterias son las cepas silvestres de *Sacharomyces sp.*, ya que si se compara con una cepa tipo esto no sería representativo ya que esta última se encuentra bien estudiada y adaptada para realizar la fermentación con grandes rendimientos. Por lo que solo se empleará la cepa tipo como referencia para las cepas silvestres.

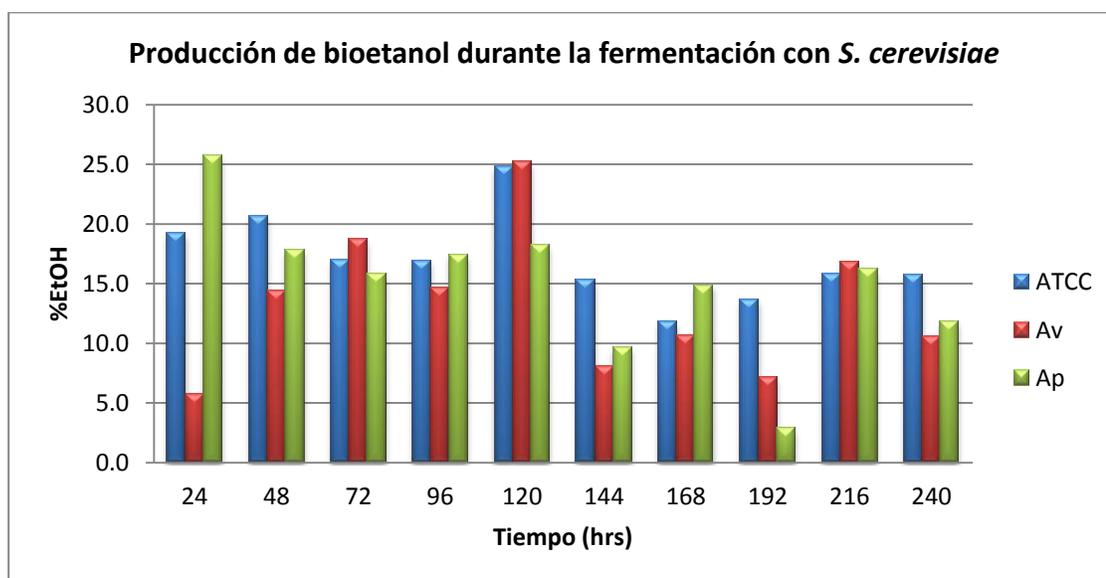


Figura 12. Porcentaje de bioetanol obtenido mediante fermentación de medio YPD con cepas de *S. cerevisiae*

De los resultados obtenidos se puede apreciar que las 3 cepas de *Sacharomyces* presentaron un comportamiento muy parecido en cuanto a cantidad de bioetanol producido a determinado tiempo, así como en la cantidad máxima producida, siendo este aproximadamente 25 % EtOH en los tres casos, variando únicamente que la cepa “Ap” produjo esta cantidad a las 24 horas mientras las otras a las 120 horas. La similitud en el comportamiento de la producción de bioetanol puede atribuirse a que las cepas silvestres empleadas, Av y Ap que provienen de vino y pan artesanales respectivamente, se encuentran adaptadas a condiciones similares a las empleadas para el experimento.

### 6.6 Prueba de toxicidad de etanol

Posteriormente a la realización de las fermentaciones alcohólicas con mixobacterias se procedió a realizar una prueba de toxicidad de etanol con una concentración conocida de este, para poder determinar si es un factor que puede afectar el rendimiento en la producción de bioetanol. Para esto se incubó un cultivo en fase logarítmica de cada cepa en medio Luria con concentraciones conocidas de etanol y se determinó la absorbancia a lo largo del tiempo.

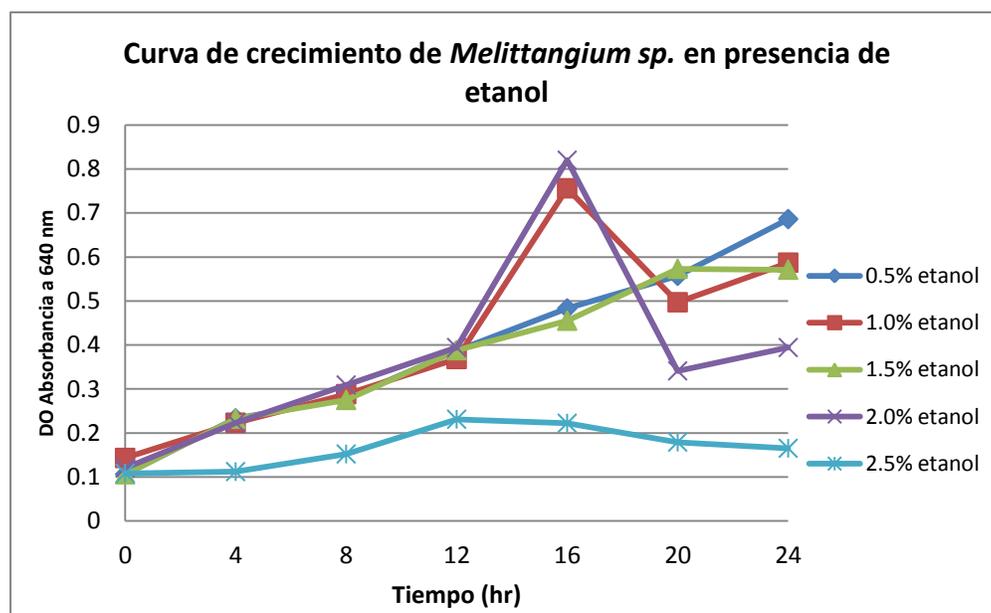


Figura 13. Densidad óptica a absorbancia de 640 nm a lo largo del tiempo, con diferente concentraciones de etanol, de *Melittangium sp.*

En la figura 13 se puede observar que a concentraciones de 0.5 % de etanol no se ve afectado el crecimiento de *Melittangium sp.* En el caso del 1.0 % de etanol se observa un aumento significativo de la densidad óptica de las 12 a las 16 horas, seguidos de una disminución de esta; esto puede deberse a que la cepa puede estar utilizando el etanol como sustrato, sin embargo finalmente se observa que se tiene una disminución en la densidad óptica (0.587), respecto a la concentración de 0.5% de etanol (0.686). Al tener 1.5% de etanol se puede apreciar un comportamiento muy parecido al 0.5 % de etanol, sin embargo a las 20 horas se presenta una disminución de la densidad óptica y finalmente se obtiene una densidad óptica menor (0.394) que en el caso de 0.5 % de etanol (0.686). En el caso de 2.0 % de etanol se observa una tendencia similar que con 1.0 % de etanol, pero al llegar a las 24 horas se obtiene una densidad óptica mucho menor (0.394). Finalmente al tener 2.5 % de etanol en el medio se puede observar una disminución significativa de la densidad óptica respecto a los demás casos. Con estos resultados se puede concluir que al tener cantidades mayores a 0.5 % de etanol en el medio, es afectado el crecimiento de *Melittangium sp.*, por lo que al estar realizando la fermentación de los sustratos complejos el alcohol producido por encima del 0.5 % empezará a inhibir el crecimiento de la cepa y por ende la cantidad de bioetanol producido será baja.

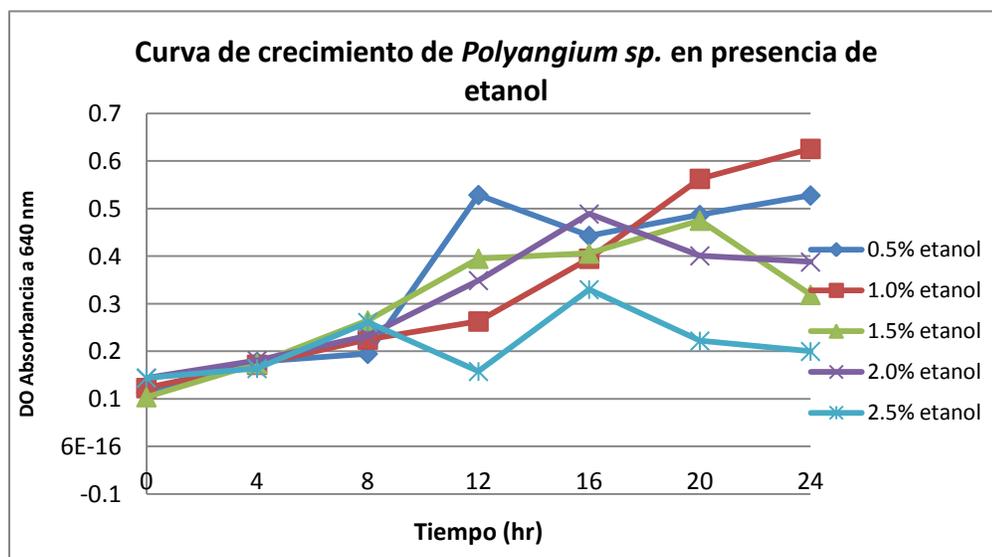


Figura 14. Densidad óptica a absorbancia de 640 nm a lo largo del tiempo, con diferente concentraciones de etanol, de *Polyangium sp.*

En la figura 14 se puede observar que a concentraciones de 0.5 % de etanol aumenta la densidad óptica desde el comienzo hasta las 12 horas y después disminuye y posteriormente a las 16 comienza a aumentar la densidad óptica, este comportamiento puede deberse a una adaptación de *Polyangium sp.* a las condiciones del medio. En el caso del 1.0 % de etanol se observa que el etanol no afecta el crecimiento de *Polyangium sp.*, ya que presenta una curva de crecimiento normal. Al tener 1.5% de etanol se puede apreciar una disminución apreciable de la densidad óptica a partir de las 20 horas. En el caso de 2.0 % de etanol se observa un aumento de la densidad óptica a lo largo del tiempo hasta las 16 horas, donde comienza la disminución de esta. Por último al tener 2.5 % de etanol en el medio se puede observar una disminución de la densidad óptica a las 8 horas, posteriormente un aumento de esta de las 12 a las 16 horas y posterior a las 16 horas una disminución constante de la densidad óptica, este comportamiento puede deberse a que *Polyangium sp.* trata de adaptarse a las condiciones del medio, resultando al final muy tóxicas para su desarrollo. De estos datos se puede concluir que al tener cantidades mayores a 1.0 % de etanol en el medio, se afecta el crecimiento de *Polyangium sp.*, por lo que al estar realizando la fermentación de los sustratos complejos al obtener una cantidad mayor al 1.0 % de etanol se comenzará a inhibir el crecimiento de la cepa y por consiguiente una baja producción de bioetanol.

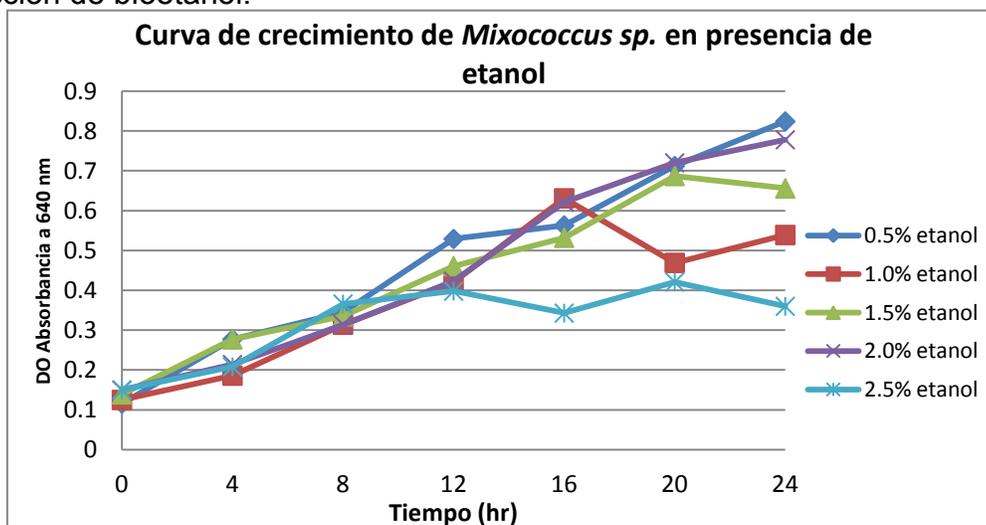


Figura 15. Densidad óptica a absorbancia de 640 nm a lo largo del tiempo, con diferente concentraciones de etanol, de *Mixococcus sp.*

En la figura 15 se puede observar que a concentraciones de 0.5 % de etanol no se ve afectado el crecimiento de *Mixococcus sp.* En el caso del 1.0 % de etanol se observa de las 16 a las 20 horas una disminución en la densidad óptica y posterior a las 20 horas un aumento en esta, esto puede deberse a la adaptación de *Mixococcus sp.* a las condiciones del medio, sin embargo la densidad óptica a las 24 horas es menor (0.539) respecto al caso con 0.5 % de etanol (0.824). Al tener 1.5% de etanol se puede observar un comportamiento similar al caso con 0.5 % de etanol, sin embargo a las 20 horas se observa una disminución de la densidad óptica, puede deberse a que el etanol está afectando el crecimiento de *Mixococcus sp.* En el caso de 2.0 % de etanol se puede observar una tendencia de comportamiento igual al caso con 0.5 % de etanol, sin embargo los valores de densidad óptica son menores en la mayoría de los puntos. Y al tener 2.5 % de etanol en el medio se puede observar una tendencia oscilatoria a partir de las 12 horas, esto posiblemente a que *Mixococcus sp.* este tratando de adaptarse al medio, sin embargo la densidad óptica obtenida es menor que en los demás casos. Con esto se puede concluir que al tener cantidades mayores a 0.5 % de etanol en el medio, se afecta el crecimiento de *Mixococcus sp.*, por lo que al estar realizando la fermentación de los sustratos complejos al producir por encima del 0.5 % de etanol el crecimiento de la cepa se verá disminuido gradualmente y por lo tanto se obtendrá una cantidad de bioetanol baja.

Por lo tanto durante la fermentación de los sustratos complejos, el alcohol producido presente en el medio afectara el crecimiento de las cepas y como consecuencia una baja producción de bioetanol. De manera general, a cantidades mayores a 1.0 % de etanol, este resulta tóxico para las células, inhibiendo el crecimiento microbiano y el metabolismo celular al verse afectado las componentes celulares por acción del etanol.

## **6.7 Purificación parcial de celulasa**

### **Separación electroforética de proteínas en gel discontinuo de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio**

Posterior a la prueba de hidrólisis se procedió al aislamiento y purificación parcial de la celulasa.

La separación y purificación de proteínas fue necesaria para llevar a cabo el estudio y caracterización de las enzimas producidas. Para ello, se separaron selectivamente a partir de muestras complejas mediante un procedimiento de fraccionamiento empleando filtros Amicon de diferente diámetro de poro.

Debido a que la cantidad de SDS que se une a las proteínas es prácticamente proporcional a su tamaño, los complejos SDS-proteínas presentan un valor carga/masa constante y por lo tanto se separan de acuerdo a su tamaño cuando migran desde el cátodo al ánodo a una velocidad relacionada con su peso molecular. Además del SDS, se emplean otros agentes desnaturizantes como son un agente reductor, generalmente el 2-mercaptoetanol que reduce los puentes disulfuro (Cys-S-S-Cys) a grupos tioles (Cys-SH), y rompen puentes de hidrógeno. Para asegurar la disociación de las proteínas en sus subunidades y la pérdida de la estructura secundaria se suele calentar la muestra antes de ser cargada en el gel. A diferencia de la electroforesis en condiciones nativas, en la SDS-PAGE las proteínas se separan únicamente en función de su tamaño.

Los patrones electroforéticos obtenidos en PAGE-SDS fueron característicos y de gran reproducibilidad, presentando bandas nítidas y bien definidas.

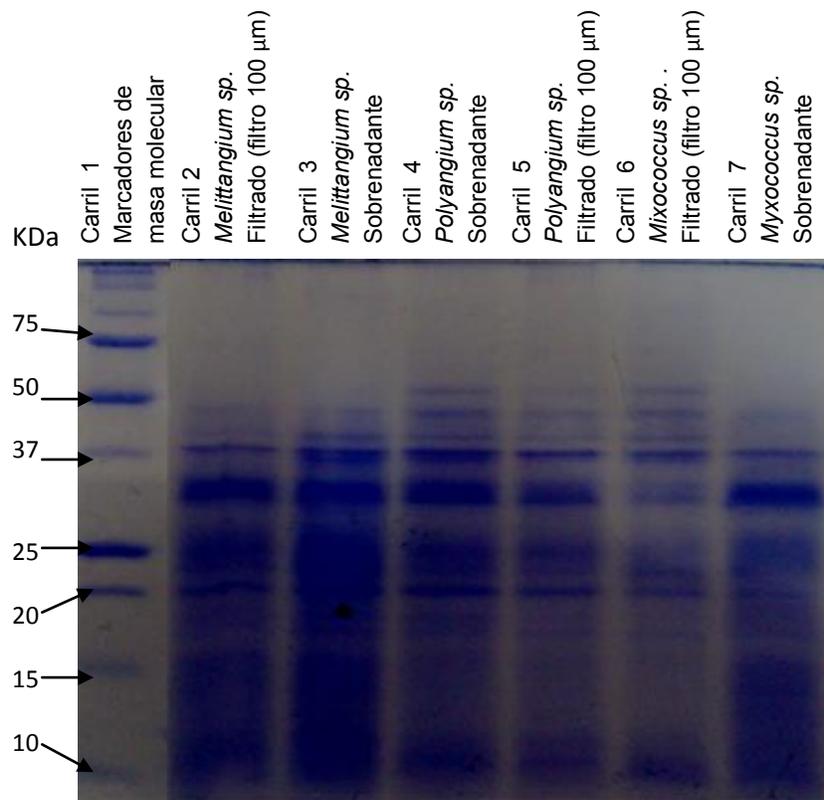


Figura 16. Análisis electroforético de las distintas etapas de la purificación de la celulasa. Gel de Poliacrilamida al 12.5% en condiciones desnaturalizantes, teñido con azul de Coomassie. Carril 1: marcadores de masa molecular. Carril 2: muestra proveniente del filtrado del sedimento precipitado con sulfato de amonio al 90% (10 µg); Carril 3: muestra proveniente directamente del sobrenadante del cultivo (10 µg); Carril 4: muestra proveniente directamente del sobrenadante del cultivo (10 µg); Carril 5: muestra proveniente del filtrado del sedimento precipitado con sulfato de amonio al 90% (10 µg); Carril 6: muestra proveniente del filtrado del sedimento precipitado con sulfato de amonio al 90% (10 µg); Carril 7: muestra proveniente directamente del sobrenadante del cultivo (10 µg).

Al analizar en la figura 16 el patrón electroforético de las exoenzimas producidas por las diferentes cepas podemos ver que fue muy parecido entre sí, diferenciándose únicamente en las banda comprendidas cerca del peso molecular 50, la cual no aparece en la cepa *Melittangium sp.* (Carril 2 y 3). En todas las muestras se presentaron claramente hasta 3 bandas con movilidades entre 50 y 37 KDa.

Este gel nos muestra la posible presencia de la enzima en cada una de las muestras, desde el sobrenadante, donde se observa una gran cantidad de bandas

gruesas poco claras y nítidas, hasta la muestra de la enzima filtrada, donde se puede apreciar bandas más claras y definidas.

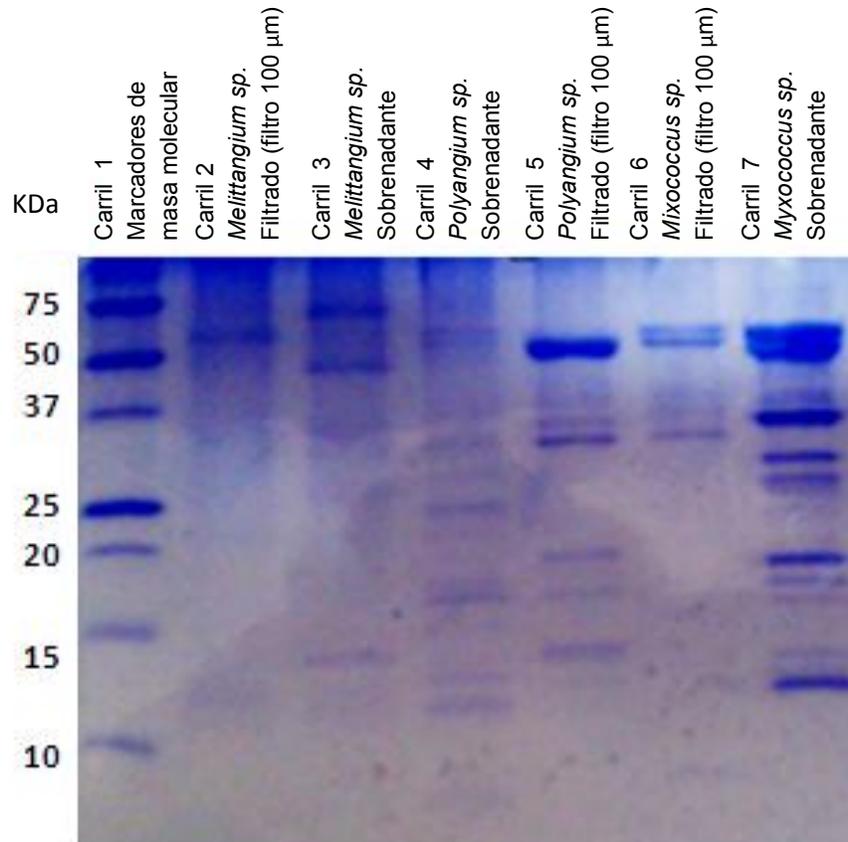


Figura 17. Análisis electroforético de las distintas etapas de la purificación de la celulasa. Gel de Poliacrilamida al 12.5 % en condiciones desnaturalizantes, teñido con azul de coomasie. Carril 1: marcadores de masa molecular. Carril 2: muestra proveniente del filtrado del sedimento precipitado con sulfato de amonio al 90 % (10 μg); Carril 3: muestra proveniente directamente del sobrenadante del cultivo (10 μg); Carril 4: muestra proveniente directamente del sobrenadante del cultivo (10 μg); Carril 5: muestra proveniente del filtrado del sedimento precipitado con sulfato de amonio al 90% (10 μg); Carril 6: muestra proveniente del filtrado del sedimento precipitado con sulfato de amonio al 90 % (10 μg); Carril 7: muestra proveniente directamente del sobrenadante del cultivo (10 μg).

En la figura 17 se puede observar el análisis electroforético de las distintas cepas productoras de exoenzimas. Este corresponde a las mismas muestras del gel anterior pero sometidas a un segundo filtrado para así obtener muestras más puras y bandas mejor definidas. Podemos ver en cada carril la clara presencia de proteínas en un rango de peso molecular de 50 a 75 KDa.

El peso molecular (PM) determinado por SDS-PAGE reportado por Lee, Y-J *et al.* (2008) para la celulasa es de 53 KDa, peso similar al que se observa en la figura 17, donde se puede apreciar que el PM de la posible celulasa de las muestras es de 50 kDa. Este mismo autor también reporta que la celulasa se puede encontrar entre los 37 - 47 KDa y 61 - 78 KDa, variando según el microorganismo. En este sentido, podemos afirmar que la celulasa parece encontrarse presente en las muestras y, además, cabría la posibilidad de que se trate de un dímero ya que si observamos en los carriles 4, 5, 6 y 7 se distinguen dobletes.

Con el fin de caracterizar a la enzima purificada, y ver su comportamiento frente a la temperatura y pH, se realizaron ensayos de actividad en función de estas variables; con ellos se podrá determinar si esta enzima es apta para una futura aplicación biotecnológica

### 6.8 Efecto de la temperatura de reacción en la actividad de la celulasa.

Se realizó la medición de la actividad exocelulolítica variando la temperatura para las diferentes cepas, durante 40 minutos.

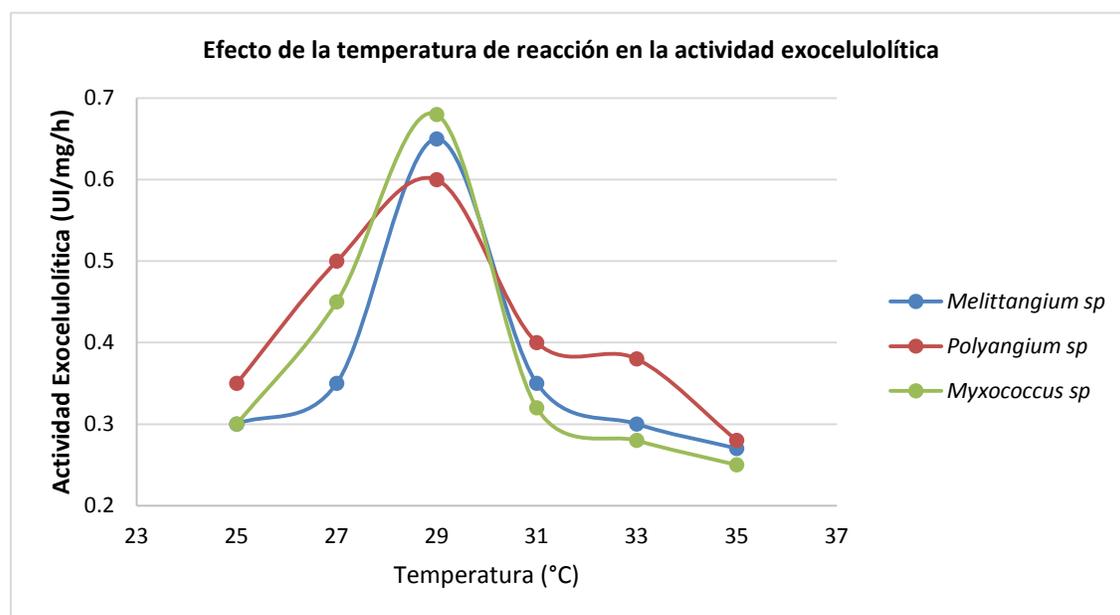


Figura 18. Efecto de la temperatura de reacción en la actividad específica de la celulasa. Ensayo realizado a distintas temperaturas durante 40 minutos.

En la figura 18 se observa que la temperatura de reacción óptima fue de 29 °C, decayendo la actividad específica fuertemente después de dicha temperatura, dicha termolabilidad es una característica común de las enzimas psicrófilicas. En el caso de una enzima mesófila su temperatura óptima de reacción puede estar cercana a los 55 °C, temperatura en la cual ya la celulasa ha perdido prácticamente el 50 % de actividad. Se puede observar también que entre los 25 y 27 °C la enzima posee entre un 60 y 80 % de su actividad.

### 6.9 Efecto del pH de reacción en la actividad de la celulasa.

Se realizó la medición de la actividad exocelulolítica variando el pH para las diferentes cepas, durante 24 horas.

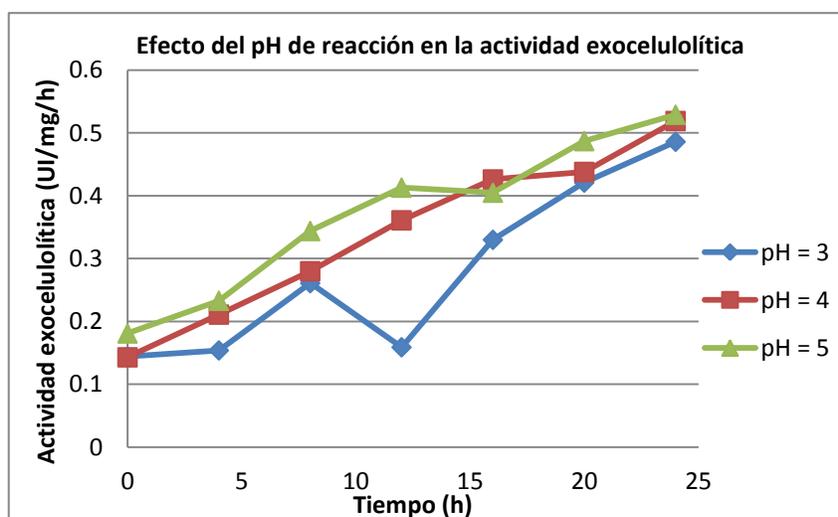


Figura 19. Efecto del pH de reacción en la actividad específica de la celulasa de *Melittangium sp.* Ensayo realizado a distintos pH durante 24 horas.

En la figura 19 se puede apreciar que la actividad específica de la celulasa, no se ve muy afectada por los diferentes pH probados, ya que muestra un comportamiento similar en los tres casos; sin embargo, se apreció una actividad un poco mayor con pH= 5.

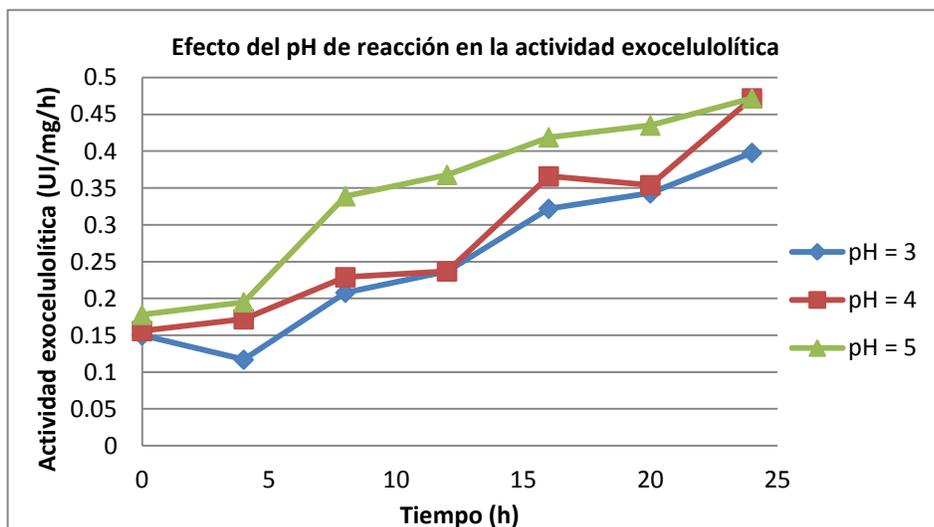


Figura 20. Efecto del pH de reacción en la actividad específica de la celulasa de *Polyangium sp.* Ensayo realizado a distintos pH durante 24 horas.

En la figura 20, se aprecia que la actividad específica de celulasa es mayor a pH= 5 a lo largo del tiempo, mientras que a pH 3 y 4 se observa un comportamiento muy similar. Sin embargo, después de las 16 horas la actividad enzimática a pH=4 se comienza a acercar a los valores de actividad a pH=5, siendo iguales al llegar a las 24 horas.

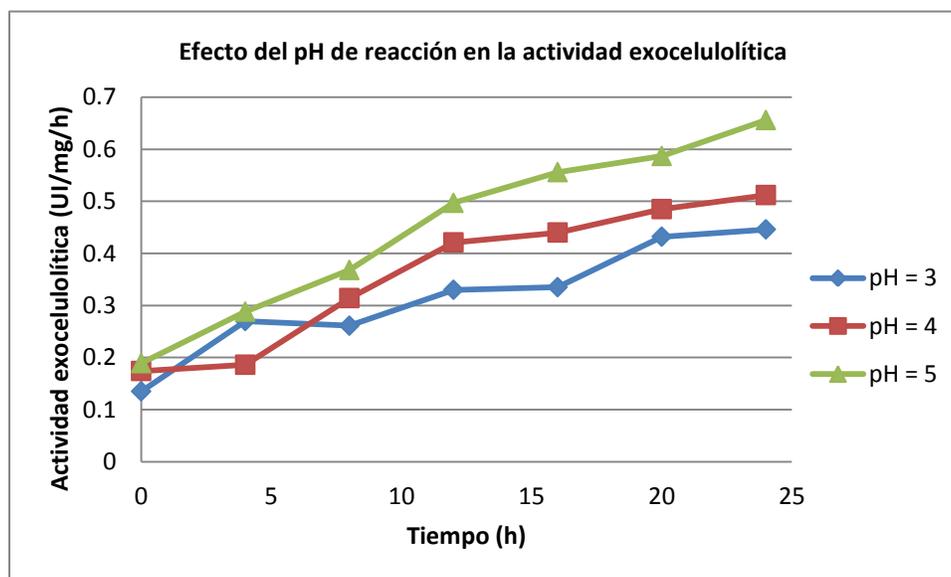


Figura 21. Efecto del pH de reacción en la actividad específica de la celulasa de *Myxococcus sp.* Ensayo realizado a distintos pH durante 24 horas.

En la figura 21, es muy claro el efecto del pH en la actividad enzimática, ya que conforme aumenta el pH va aumentando la actividad enzimática de la cepa a lo largo del tiempo.

Como se puede apreciar tanto en las figuras 19, 20 y 21, el pH de reacción óptimo fue de pH = 5. Dicho comportamiento se puede deber a que las enzimas son estables a pH's cercanos a 7 y por ende al ser más estable se obtendrá una mayor actividad.

# Conclusiones

- Las bacterias deslizantes seleccionadas por su capacidad celulolítica y pectinolítica fueron capaces de producir bioetanol a partir del sustrato complejo seleccionado, cáscara de manzana a pH=5, *Myxococcus sp.* (1.393 % EtOH), *Cytophagales sp.* (1.056 % EtOH), *Melittangium sp.* (1.288 % EtOH) y *Polyangium sp.* (1.393 % EtOH).
- La prueba de toxicidad de etanol indica que las bacterias deslizantes son sensibles a la cantidad de etanol en el medio, lo que afecta la cantidad de bioetanol que pueden producir.
- Al no ser similar la cantidad de bioetanol producido por las mixobacterias al producido por *Sacharomyces sp.* se sugiere buscar otras condiciones de hidrólisis y/o de fermentación para que se obtenga un rendimiento similar o mayor.
- Se logró aislar y purificar a la celulasa para posteriores aplicaciones como pretratamiento de sustratos lignocelulósicos en procesos de obtención de bioetanol.
- Durante la purificación parcial de las enzimas se logró obtener una gran cantidad de proteína con la precipitación con sulfato de amonio y una purificación parcial a través del uso de los filtros Amicon, con un buen rendimiento, el cual podría mejorarse.
- Se logró obtener en forma semi-pura celulasa, del tipo exoglucanasa, observándose una banda a la altura de los 50 kDa aproximadamente.
- Se caracterizaron las condiciones para optimizar la actividad de la enzima con una temperatura de 29 °C y un pH de 5, con lo cual se podrán hacer estudios posteriores acerca de la fermentación.

# Perspectivas

- Explorar el potencial de la celulasa aislada y purificada de las mixobacterias, en la aplicación a tecnologías de producción de bioetanol, principalmente en el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos
- Determinar la posible utilización de mixobacterias y *S. cerevisiae* de manera consecutiva en el proceso de producción de bioetanol, para lograr bajar costos de producción al disminuir cantidad de reactores y condiciones de fermentación.

# Referencias

1. Anwar, Z., *et al.*, “Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review”. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jrras.2014.02.003>
2. Baek, S., *et al.* “Cellulosic ethanol production by combination of cellulose-displaying yeast cells”. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol 51. 2012, pp. 366-372.
3. Balat, M. “Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review”. *Energy Conversion and Management*. Vol 52. 2011, pp. 858-875.
4. Chirinos R., S. L. (2008). *Caracterización inicial de la actividad pectinolítica de mixobacterias y citofagas*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
5. Coppola, F., *et al.* “Sustainability of bioethanol production from wheat with recycled residues as evaluated by Emergy assessment”. *Biomass and Bioenergy*. Vol 33. 2009, pp. 1626-1642.
6. Dawid, W. “Biology and global distribution of myxobacteria in soils”. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol 24. 2000, pp. 403-427.
7. E. Whitworth, D. “Myxobacterial Vesicles: Death at a Distance?” *Advances in Applied Microbiology*. Vol 75. 2011, pp. 1-31.
8. Garcia, A., *et al.* “Evaluation of different lignocellulosic raw materials as potential alternative feedstocks in biorefinery processes” *Industrial Crops and Products*. Vol. 53. 2014, pp. 102– 110.

9. Godínez A., P. (2011). *Caracterización de bacterias deslizantes como alternativa biotecnológica*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
10. J. Weissman, K. y Müller, R. "A brief tour of myxobacterial secondary metabolism". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Vol 17. 2009, pp. 2121-2136.
11. Juturu, V. Chuan Wu, J. "Microbial cellulases: Engineering, production and applications". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol. 33, 2014, pp. 188–203.
12. K. Sukumaran, R., *et al.* "Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production". *Renewable Energy*. Vol 34. 2009, pp. 421-424.
13. Lark, N., *et al.* "Production of ethanol from recycled paper sludge using cellulose and yeast, *Kluyveromyces marxianus*". *Biomass and Bioenergy*. Vol 12. 1997, pp. 135-143.
14. Lee, Y-J, *et al.* "Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull". *Bioresource Technology*. Vol. 99. 2008, pp. 378–386.
15. Lever, M., *et al.* "Ethanol from lignocellulose using crude unprocessed cellulose from solid-state fermentation". *Bioresource Technology*. Vol 101. 2010, pp. 7083-7087.
16. Limayen, A. y Ricke, S. C. "Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects". *Progress in Energy and Combustion Science*. Vol 38. 2012, pp. 449-467.

17. Mabee, W. E. y Saddler, J. N. "Bioethanol from lignocellulosics: Status and perspectives in Canada". *Biosource Technology*. Vol 101. 2010, pp. 4806-4813.
18. Nanaka, H., *et al.* "Behavior of lignin-binding cellulase in the presence of fresh cellulosic substrate". *Bioresource Technology*. Vol 135. 2013, pp. 53-57.
19. Orozco C., K. I., (2007). *Aislamiento y caracterización de bacterias celulolíticas de muestras ambientales para su posible aplicación biotecnológica*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
20. Percival Zhang, Y.-H., *et al.* "Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies". *Biotechnology Advances*. Vol 24. 2006, pp. 452-481.
21. Rabelo, S.C., *et al.* "Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept". *Bioresource Technology*. Vol 102. 2011, pp. 7887-7895.
22. Rani Singhania, R., *et al.* "Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases". *Enzyme and Microbial Technology*. Vol 46. 2010, pp. 541-549.
23. Reichenbach, H. y Höfle, G. "Biologically active secondary metabolites from myxobacteria". *Biotechnology Advances*. Vol 11. 1993, pp. 219-277.

24. Rodriguez, A. C., *et al.* "Recycling of cellulases in lignocellulosic hydrolysates using alkaline elution". *Bioresource Tehnology*. Vol 100. 2012, pp. 526-533.
25. Rodriguez Aliaga, O. F. (2010) *Métodos Para Determinar La Presencia De Etanol En El Organismo*. Bolivia, Facultad De Ciencia Farmacéuticas Y Bioquímicas, Universidad Mayor De San Andrés.
26. Roy, P., *et al.* "Evaluation of the cycle of bioethanol produced from rice straws". *Bioresource Technology*. Vol 100. 2012, pp. 239-244.
27. Sanchez, C. "Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi". *Biotechnology Advances*. Vol 27. 2009, pp. 185–194.
28. Saravanakumar, K., *et al.* "Bioethanol production by mangrove-derived marine yeast, *Sacchromyces cerevisiae*". *Journal of King Saud University – Science*. Vol 25. 2013, pp. 121-127.
29. Sarkar, N., *et al.* "Biological production from agricultural wastes: An overview". *Renewable energy*. Vol 37. 2012, pp. 19-27.
30. Schägger, H. y Von Jagow, G. "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa". *Anaytical Biochemistry*. Vol 166 (2). 1987, pp. 368-379.
31. Singh Jayani, R., *et al.* "Microbial pectinolytic enzymes: A review". *Process biochemistry*. Vol. 40 (9). 2005, pp. 2931–2944.

32. Sun, X., et al. "The composition of basal and induced cellulose systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions". *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 42. 2008, pp. 560-567.
33. Ximenes, E., et al. "Inhibition of cellulases by phenols". *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 46. 2010, pp. 170-176.
34. Yan, Z., et al. "Morphologies and phylogenetic classification of cellulolytic myxobacteria". *Systematic and applied microbiology*. Vol 26. 2003, pp. 104-109.
35. Zhu, Y., et al. "Cellulose and cellodextrin utilization by the cellulolytic bacterium *Cytophaga hutchisonii*". *Bioresource Technology*. Vol. 101. 2010, pp. 6432-6437.

# Anexos

## Medios de Cultivo

### Medio Mineral

Cantidades de reactivo para preparar 100 mL de las soluciones para la preparación medio mineral:

Sustancia	Cantidad (mg)
Sulfato de amonio ( $\text{NH}_4\text{SO}_4$ )	2.00
Fosfato ácido de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	3.90
Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	7.50
Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	2.00
Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA)	0.10
Citrato de sodio	0.60
Sulfato de hierro ( $\text{FeSO}_4$ )	0.30
*Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	2.86
*Cloruro de manganeso ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0.181
*Permanganato de sodio ( $\text{NaMnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.191
*Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.79
*Nitrito de cobalto ( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	0.0494
*Sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.222
*Cloruro de Calcio ( $\text{CaCl}$ )	0.0494

Se toma 1 mL de cada una de las sustancias marcadas con \* y se aforan a 100 mL con agua destilada, estas sustancias se almacenan en frasco ámbar, estas son los micronutrientes.

Cantidades de reactivo para preparar 1000 mL de medio mineral

Solución	Cantidad (mL)
Sulfato de amonio ( $\text{NH}_4\text{SO}_4$ )	10
Fosfato ácido de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	1
Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	1
Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	1
Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA)	1
Citrato de sodio	1
Sulfato de hierro ( $\text{FeSO}_4$ )	1
Micronutrientes	1
H <sub>2</sub> O destilada	983

Se toma la cantidad indicada de cada una de las sustancias y se lleva a aforo a 1000 mL con agua destilada, almacenar en frasco ámbar.

Las sustancias de los reactivos para prepara el medio mineral son esterilizadas previamente y la reparación de los reactivos se realiza en zona aséptica.

### Medio YPD

Cantidades para preparar 1000 mL de medio YPD

Sustancia	Cantidad (g)
Glucosa	20
Extracto de levadura	20
Polipeptona	20

En caso de preparar medio sólido agregar agar en un 2-3 % del total de medio, llevar a aforo con agua destilada y esterilizar el medio.

### Medio Luria

Cantidades para preparar 100 mL de medio Luria

Sustancia	Cantidad (g)
Cloruro de Sodio	0.5
Triptona	1.0
Extracto de levadura	0.5

Llevar a aforo con agua destilada y esterilizar el medio.

### Medio YPG

Cantidades para preparar 100 mL de medio Luria

Sustancia	Cantidad (g)
Glucosa	2.0
Peptona	1.0
Extracto de levadura	1.0

Ajustar a pH= 4 – 5, llevar a aforo con agua destilada y esterilizar el medio.

## Curvas patrón

### Curva Patrón DNS

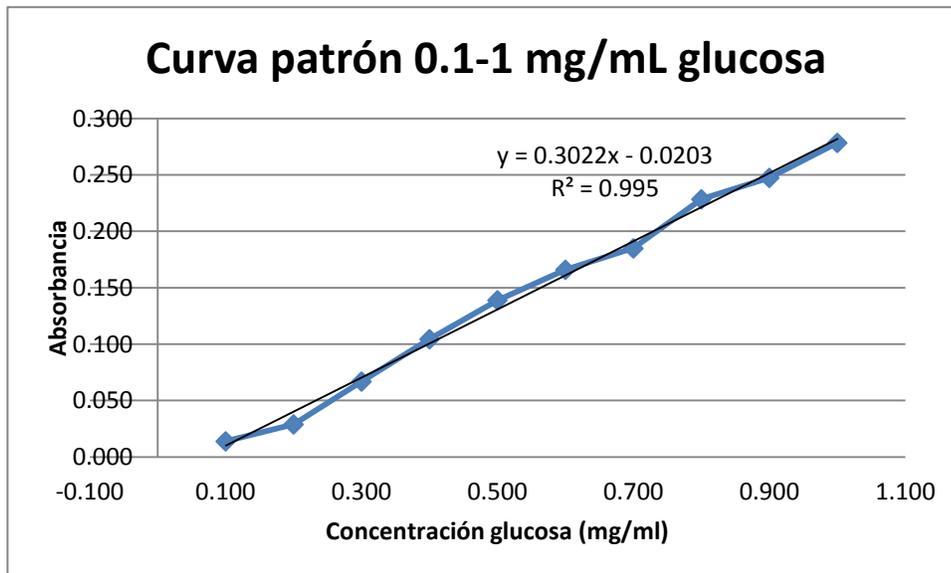
Reactivo DNS

Cantidades de reactivo para preparar 100 mL del reactivo DNS:

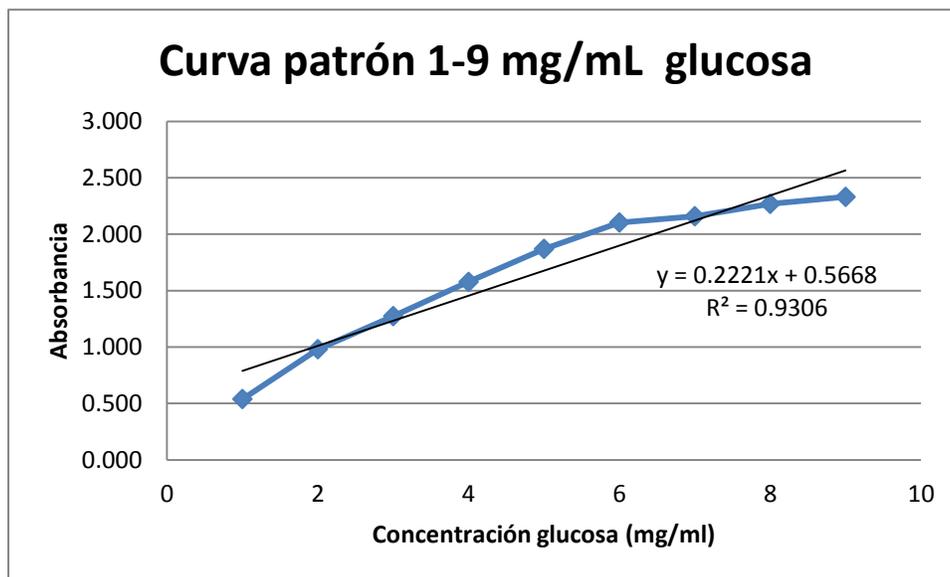
Reactivo	Cantidad (g)
Hidróxido de Sodio (0.35M)	1.40
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	0.75
Tartrato de sodio y potasio	10
Fenol	0.54
Metabisulfito de sodio	0.59

Para preparar el reactivo DNS primero se disuelve el hidróxido de sodio en 20 mL de agua destilada, por otra parte se disuelve el Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) en no más de 40 mL de agua destilada; una vez disuelto el DNS se adiciona a la solución de hidróxido de sodio con agitación constante. Se agregan los demás reactivos en el orden que se indica en la tabla anterior, añadiendo cada uno hasta la disolución completa del anterior. Finalmente aforar a 100 mL con agua destilada y resguardar el reactivo en recipiente ámbar.

Se realiza primeramente una curva patrón de glucosa de concentración conocida que abarca de 0.1 a 1 mg/mL, para esto se preparan soluciones stock utilizando glucosa y agua destilada, una vez obtenidas las soluciones stock se procede a la cuantificación de la absorbancia de estas muestras, para ello a la muestras se le adiciona 0.5 mL del reactivo de DNS, se calientan a ebullición por 5 minutos mediante un baño María y al termino del caliente se añaden 5 mL de agua destilada dejando reposar 10 minutos antes de leer la absorbancia de la mezcla de reacción a una  $\lambda=575$  nm. Obteniendo de esta manera los siguientes resultados:



Posteriormente se realiza otra curva patrón de concentración conocida de glucosa, esta abarca de 1 a 9 mg/mL, se preparan soluciones stock utilizando glucosa y agua y se determinan la absorbancia siguiendo el método anterior descrito. Se obtienen los siguientes resultados:

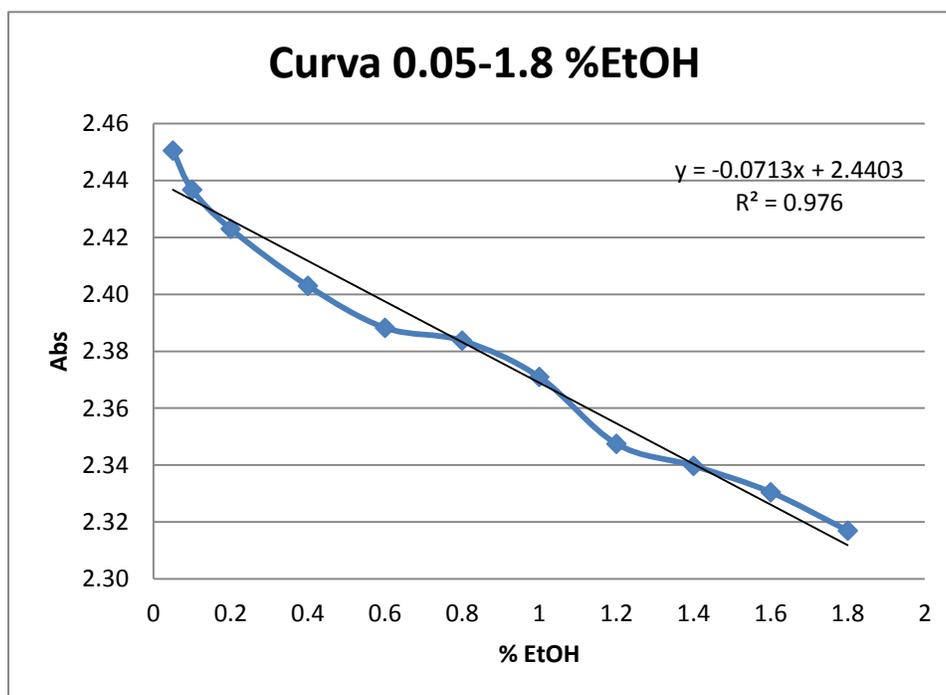


### Curva patrón %EtOH

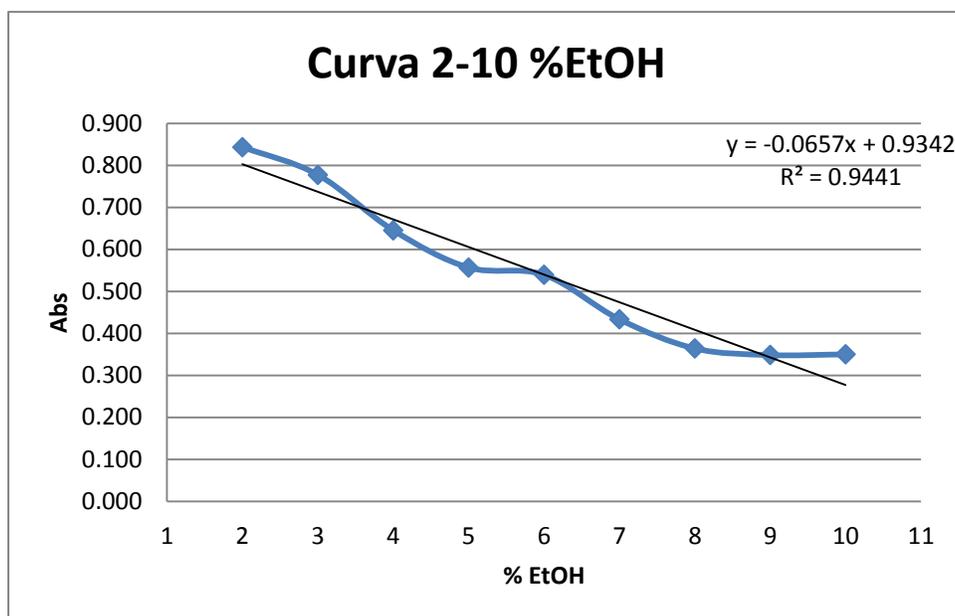
Para la realización de la curva patrón de EtOH, se procede a preparar soluciones de EtOH de concentración conocidas, utilizando etanol absoluto y agua destilada, abarcando un rango de 0.05 a 1.8 % de Etanol. Una vez obtenidas las soluciones stock se procede a realizar las determinaciones utilizando el método de

microdifusión que consiste en dos tubos de ensaye uno dentro de otro, en el tubo exterior (cámara de Conway) se colocan 0.5 mL de solución saturada de carbonato de potasio y en el tubo interno se agrega 1.0 mL de una solución de dicromato de potasio al 0.145% en ácido sulfúrico 10 N.

En el compartimiento exterior se agrega 0.1 mL de la solución stock y se tapa el tubo exterior. Este dispositivo se incuba mediante baño María a 45°C por 60 minutos, al finalizar el calentamiento se agrega 0.5 mL de agua destilada y se procede a medir la absorbancia a una  $\lambda = 450$  nm. De esta manera se obtuvieron los siguientes resultados:



Se procede de igual manera para la realización de una curva patrón de %EtOH que abarca de 2 a 10% EtOH, siguiendo la metodología anteriormente descrita se obtuvieron los siguientes resultados:



### SDS- PAGE (Von Jagow)

- Cantidades para preparar 100 mL de Buffer gel pH 8.45 (3X)

<b>Sustancia</b>	<b>Concentración</b>	<b>Cantidad (g)</b>
Tris	3 M	36,34g
SDS	0.30%	0,3g

Se debe filtrar con membrana de 0.25µm

- Cantidades para preparar 10 mL de Buffer de carga

<b>Sustancia</b>	<b>Concentración</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Conc. final</b>
Buffer gel		1.25 mL	
SDS	10%	1.0 mL	10 % <sub>f</sub>
Glicerol		1.5 mL	15 % <sub>f</sub>
DTT	1 M	10 µL	1 mM
Azul de bromofenol		2 mg	

- Cantidades para preparar 1 L de Buffer superior cátodo pH 8.25

Sustancia	Cantidad	Conc. Final
Tris	12.11 g	0.1 M
Tricina	17.93 g	0.1 M
SDS	1 g	0.10%

- Cantidades para preparar 1 L de Buffer inferior ánodo pH 8.93

Sustancia	Cantidad	Conc. Final
Tris- HCl	24.06 g	0.2 M

### Preparación del Gel

	Separador	Concentrador
	16%	4%
ABmix 30 %	3.2 mL	0.533 mL
Buffer gel 3X	2 mL	2 mL
Glicerol 80 %	0.8 mL	–
H <sub>2</sub> O	–	2.466 mL
PSA 10 %	30 µL	30 µL
TEMED	3 µL	3 µL

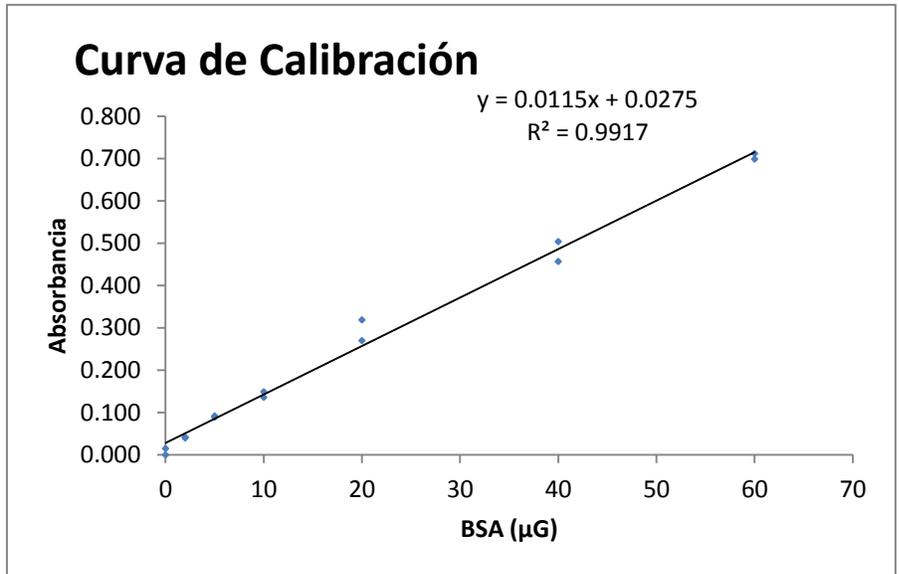
Antes de cargar las muestras, deben hervirse durante 5 min.

El gel corre a 100V hasta alcanzar el separador y posteriormente se aumenta a 120V.

El tiempo aproximado de corrida es de 1 ½ h.

## Cantidad de proteína en gel

CURVA PATRÓN	
µg BSA	Absorbancia
0	0.000
0	0.015
2	0.042
2	0.040
5	0.092
5	0.089
10	0.149
10	0.136
20	0.319
20	0.270
40	0.457
40	0.504
60	0.712
60	0.699



MUESTRAS PROBLEMA			
	Absorbancia	Conc. (µg/µL)	σ
<i>Melittangium sp.</i> Filtrado	0.230	18.45	0.250
<i>Melittangium sp.</i> Sobrenadante	0.231	18.55	
<i>Polyangium sp.</i> Sobrenadante	0.237	19.09	
<i>Polyangium sp.</i> Filtrado	0.240	19.36	
<i>Myxococcus sp.</i> Filtrado	0.269	19.75	
<i>Myxococcus sp.</i> Sobrenadante	0.290	20.15	

Conc. Promedio (µg/µL)	19.23
------------------------	-------