



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

“IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE MICROORGANISMOS
CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA
IMPLICADA EN LA HIDRÓLISIS DE CELULOSA CONTENIDA EN PAPEL BOND CON
TINTA.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A :

EMMA GABRIELA MEDINA CORTÉS

ASESORA

M. en C. SOCORRO SANDRA MARTÍNEZ ROBLES

co **ASESOR**

QFB LUIS ALBERTO PARRA OAXACA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

CRÉDITOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio L-8 de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán a cargo del Dr. Andrés Romero Rojas y en los laboratorios de microbiología de la FES – Cuautitlán.

El primo aislamiento y recolección de suelo y muestras vegetales se realizaron en el municipio de Hueyoxtla por los alumnos del CBT “Dr. Efraín Hernández Xolocotzi”, bajo la supervisión y dirección del QFB. Luis Alberto Parra Oaxaca, con recursos del COMECYT.

“La ciencia no es perfecta, con frecuencia se utiliza mal, no es más que una herramienta, pero es la mejor herramienta que tenemos, se corrige a sí misma, está siempre evolucionando y se puede aplicar a todo. Con esta herramienta conquistamos lo imposible.”

- Carl Sagan



DEDICATORIA

A mis padres, Aldegunda Cortés Félix y José Francisco Medina Pérez que me han enseñado a estar orgullosa de mis raíces y de quien soy, que me han apoyado, orientado e impulsado a alcanzar mis sueños y objetivos porque son mi mayor inspiración y el mejor ejemplo de que cuando se tienen objetivos claros no importa si se tiene el origen más humilde con esfuerzo y dedicación se pueden lograr. Los amo

A mi hermana Sara Cristina Medina Cortés “Monkey” por ser mi mejor amiga y compañía en todo momento, por compartir todo, eres mi orgullo hoy y siempre, te quiero infinitamente.

A mis abuelitos Benita y Salomón y a mi tío Félix, que desde donde estén me están cuidando como siempre lo hacían, siempre están en mi mente y corazón y espero estén orgullosos.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por ser mi segundo hogar, por todo lo vivido dentro y fuera de sus aulas, por formarme como profesionista y ampliar mi horizonte.

A mi asesora la Maestra Sandra Martínez Robles y al Maestro Erik González Ballesteros, gracias por su apoyo incondicional, enseñanzas y consejos y sobre todo muchas gracias por su amistad.

Al profesor Luis Alberto Parra Oaxaca por confiar en mí y dejarme participar de este proyecto y darme plena libertad para tomar decisiones y de desarrollar mis habilidades al realizarlo.

A mis amigos Aleluu, Ana, Cony, Chino, Dominga, Elay, Frucsi, Jacky, Juan, Karencita, Wicha, Maribis, Lalas, Pony, Robersta que se convirtieron en mi segunda familia, gracias por el apoyo, sonrisas, pláticas y todo lo vivido, porque sin ustedes todo hubiera sido muy aburrido.

Especialmente a mi amigo Alejandro Barraeta por apoyarme tanto en la parte experimental del proyecto, gracias por todo lo que hemos compartido y espero sigamos compartiendo y por ser un enorme apoyo en está y muchas otras cosas, te quiero muchísimo grumpy.

A. INDICE

CRÉDITOS	I
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
<u>A. INDICE</u>	<u>V</u>
INDICE DE FIGURAS	VIII
INDICE DE TABLAS	IX
INDICE DE GRÁFICAS	X
<u>B. ABREVIATURAS</u>	<u>XI</u>
<u>C. INTRODUCCIÓN</u>	<u>1</u>
<u>D. MARCO TEÓRICO</u>	<u>2</u>
1. EL PAPEL BOND Y LA CELULOSA	2
1.1. PULPAJE	2
1.2. BLANQUEAMIENTO.	3
1.3 CELULOSA	3
2.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA TINTA PARA IMPRESORA	5
2.2. EFECTO DE LA TINTA SOBRE HONGOS Y BACTERIAS.	6
3. DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA	6
3.1. CLASIFICACIÓN DE LA GLUCOSIL HIDROLASAS	7
3.2. ENZIMAS IMPLICADAS EN LA DEGRADACIÓN DE CELULOSA	8
3.3. ENDOGLUCANASAS	8
3.4. EXOGLUCANASAS	9
3.5 β - GLUCOSIDASAS	9

3.6	REPRESIÓN CATABÓLICA	10
3.7.	RETORREPRESIÓN	11
4.	MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS	11
4.1.	FISIOLOGÍA DE LOS ORGANISMOS CELULOLÍTICOS.	11
4.1.2	CELULOSOMA	12
4.1.2.1	ESTRUCTURA DEL CELULOSOMA.	12
4.2.	ADHESIÓN Y FORMACIÓN DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO DE LOS MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS AEROBIOS.	13
4.3.	ADHESIÓN Y FORMACIÓN DE COMPLEJOS ENZIMÁTICOS DE LOS MICROORGANISMO CELULOLÍTICOS ANAERÓBICOS.	15
4.4.	CAPTACIÓN Y FOSFORILACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA HIDRÓLISIS DE LA CELULOSA.	17
5.	FACTORES QUE DETERMINAN LA DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA.	18
5.1	ESTRUCTURA DE LA CELULOSA	19
5.2.	FACTORES AMBIENTALES QUE ACTÚAN SOBRE LOS MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS.	20
5.2.1	CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO EN EL SUELO.	20
5.2.2	TEMPERATURA	20
5.2.3	OXIGENACIÓN	20
5.2.4	PH	21
5.3.	FACTORES QUE DETERMINAN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS CELULASAS.	21
5.3.1	SINERGISMO	21
5.3.2	ADSORCIÓN.	21
6.	PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA Y SU UTILIDAD INDUSTRIAL.	22
6.1	APLICACIÓN DE LA GLUCOSA A NIVEL INDUSTRIAL	22
7.1	BASES DE DATOS	23
7.2	ALINEACIÓN DE SECUENCIAS	23
F)	JUSTIFICACIÓN	25
G)	OBJETIVOS	26

1. OBJETIVO GENERAL _____	26
2. OBJETIVOS PARTICULARES _____	26
<u>H) DIAGRAMAS DE TRABAJO</u> _____	<u>27</u>
<u>DIAGRAMA DE TRABAJO BIOINFORMÁTICA</u> _____	<u>28</u>
<u>I) METODOLOGÍA</u> _____	<u>29</u>
1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CON POSIBLE CAPACIDAD CELULOLÍTICA, AISLAMIENTO PRIMARIO Y SECUNDARIO Y ANÁLISIS CUALITATIVO. _____	29
• AISLAMIENTO PRIMARIO A PARTIR DE LAS MUESTRAS RECOLECTADAS. _____	30
• EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA. _____	30
2. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y MICROSCÓPICA DE MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA _____	30
DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES _____	31
CURVA DE CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA ____	31
ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LAS ENZIMAS DE LOS MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA. _____	31
<u>I) RESULTADOS</u> _____	<u>33</u>
<u>J) DISCUSIÓN</u> _____	<u>44</u>
<u>K) CONCLUSIONES</u> _____	<u>51</u>
<u>L) PERSPECTIVAS</u> _____	<u>52</u>
<u>M) REFERENCIAS</u> _____	<u>53</u>
<u>ANEXOS</u> _____	<u>61</u>

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura química de la celulosa (Ege 2004)	4
Figura 2 Estructura de las regiones amorfas y cristalinas en las cadenas de celulosa (Stone 1968).....	5
Figura 3 Mecanismo general de la degradación de celulosa por bacterias anaerobias y hongos (Kauri y Kushner 1985).....	15
Figura 4 Mecanismo general de la degradación de la celulosa por bacterias anaerobias (Kauri y Kushner 1985).....	16
Figura 5 Ejemplos de los sitios de acción de las enzimas celulolíticas en las cadenas de celulosa.	18
Figura 6 Muestreo en cuadrícula aleatoria de suelo agrícola	29
Figura 7 Crecimiento de cepas con actividad celulolítica en agar CMC revelado con rojo Congo, las zonas de hidrólisis se observan más claras a contra luz, después del enjuague. A. Cepa 1 bacteriana, B. Cepa 2 bacteriana, C. Hongo fuliginoso, D. Hongo hialino	33
Figura 8 Medios DTM, Borelli y Urea, crecimiento tras 192 horas de crecimiento de cada una de las cepas. A. Hongo hialino anverso y reverso B. Hongo fuliginoso anverso y reverso.....	35
Figura 9 Microfotografías de las estructuras fungicas, a partir de los microcultivos tición con azul de lactofenol de los hongos hialino (A) y fuliginoso (B), 40x.	36
Figura 10 Crecimiento tras 72 horas de incubación en Agar Papel de las cepas bacterianas A. Cellvibrio japonicus y B. Pseudomonas fluorescens a 30° C y de los hongos C. Beauveria bassiana y D. Fonsecaeae compacta a temperatura ambiente	37
Figura 11 Modelos <i>tridimensional</i> las enzimas de Cellvibrio japonicus. A) glucan-1,4-β-glucosidasa B) endo-β-1,4-manasa	¡Error! Marcador no definido.
Figura 12 Modelado Tridimensional de la enzima principal de Beauveria. bassiana. Glucano-1,3-β-glucosidasa.....	¡Error! Marcador no definido.

Figura 13 Modelo tridimensional de la enzima principal de *Pseudomonas fluorescens*. Endo-1,4-D-glucanasa ¡Error! Marcador no definido.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Resumen de las enzimas implicadas en la hidrólisis de celulosa por su sitio de acción y productos generados.....	10
Tabla 2 Pruebas bioquímicas primarias de identificación de Bacterias con actividad celulolítica.....	34
Tabla 3 Pruebas bioquímicas secundarias de identificación de Bacterias con actividad celulolítica.	34
Tabla 4 Prueba de sensibilidad a los antibióticos para la Cepa 1 para la confirmación de su identidad. (Cepa probable: <i>Cellvibrio japonicus</i> .)	34
Tabla 5 Hidrólisis de Carbohidratos para la identificación de Bacterias con actividad celulolítica.....	35
Tabla 6 Hidrólisis de Carbohidratos para la identificación de Hongos con actividad Celulolítica.....	37
Tabla 7 Diametro de crecimiento cada 24 horas para los hongos <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Fonsecae compacta</i> en medio SDA. Crecimiento medido hasta las 192 horas.40	
Tabla 8 Análisis bioinformático de los genes <i>cel3c</i> , <i>man26B</i> , <i>PFLU_RS1485</i> y <i>BBA_01743</i> de microorganismo celulolíticos en GenBank.	40
Tabla 9 Secuencias homologas de los genes <i>cel3c</i> , <i>man26B</i> , <i>PFLU_RS01485</i> de bacterias celulolíticas comparadas con <i>Escherichia coli</i>	41
Tabla 10 Secuencia del gen <i>BBA_01743</i> de hongo blanco comparada con <i>Metarhizium roberstii</i>	41

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Análisis cuantitativo de la liberación de azúcares reductores a partir de la celulosa contenida en el papel bond con tinta, medida cada dos horas durante 36 horas	38
Gráfica 2 Comparación de la liberación de glucosa a partir de papel bond con tinta para cada microorganismo celulolítico durante 36 horas.	38
Gráfica 3 Curva de crecimiento respecto al tiempo de los microorganismos con actividad celulolítica utilizando como estándar a E.coli con comportamiento conocido y reportado en la literatura.....	39

B. ABREVIATURAS

NOM: Norma Oficial Mexicana

Na₂SO₄: Sulfato de sodio

CaCO₃: Carbonato de calcio

NaOH: Hidróxido de Sodio

Na₂S: Sulfuro de sodio

Cl₂: Cloro elemental

ClO₂: Dióxido de cloro

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

FeCr₂O₇: Dicromato de Hierro II

IUBMB: International Union of Biochemistry and Molecular Biology

EC: Enzyme Catalog

Glc-1-P: Glucosa-1-Fosfato

CO₂: Dióxido de carbono

H₂O: Hidróxido de hidrogeno

P_i: Fosfato inorgánico

CH₄: Metano

H₂: Hidrógeno molecular

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

DNS: Dinitrosalicílico

C. INTRODUCCIÓN

Hoy en día la generación de desechos sólidos de papel ha ido en aumento, y su destino y disposición final no siempre son las adecuadas ya que muchas veces estos terminan en vertederos municipales y estatales o incinerados por los propios generadores de residuos, lo cual genera la disminución en la calidad del aire, contaminación de los suelos y acuíferos, así como afectaciones a la salud por la proliferación de vectores y fauna nociva. (NOM-161-SEMARNAT-2011, 2013) Es por ello que actualmente se buscan alternativas con las cuales sea posible no sólo eliminar, sino reaprovechar dichos residuos de una manera amigable con el ambiente.

Los microorganismos encargados de la degradación de la celulosa, principal componente de la pared celular de las plantas incluyen bacterias, hongos y actinomicetos, aerobios, anaerobios, mesófilos y termófilos; los cuales cuentan con la maquinaria enzimática necesaria para dicho propósito, por tal razón, su aislamiento e identificación representa un importante recurso para lograr la disminución del impacto ambiental. (Lynd, Elander, & Wyman, Likely features and costs of mature biomass ethanol technology., 1996)

D. MARCO TEÓRICO

1. EL PAPEL BOND Y LA CELULOSA

La producción de papel abarca una gran parte de la industria a nivel mundial; cuya principal fuente de fibra es la madera, procedente principalmente de los bosques de coníferas, tropicales y boreales. La composición química de la madera es muy variable, se compone principalmente de celulosa, lignina, hemicelulosa y otros materiales. (Lynd, Wyman y Gerngross. 1999)

Parte del proceso básico para la obtención de la celulosa y el papel consiste en la eliminación de la lignina. Industrialmente la pulpa de celulosa blanca se obtiene a través de un proceso de dos etapas: el pulpaje y el blanqueo.

1.1. Pulpaje

El objetivo del Pulpaje es remover la lignina para liberar la fibra de celulosa, separando la celulosa contenida en la madera, de los otros componentes, dicho proceso puede ser de dos tipos; mecánico o químico.

Actualmente a nivel mundial el proceso más utilizado para el pulpaje sigue siendo el método de Kraft, pese a la gran contaminación que genera y el costo que conlleva el proceso.

En el pulpaje de Kraft, la madera es descortezada y triturada para ser enviada a digestores donde se cuece en una mezcla de agua, sulfato de sodio (Na_2SO_4), carbonato de calcio (CaCO_3) e hidróxido de sodio (NaOH) a 200°C y altas presiones para formar una sola pulpa que es llevada a una solución de hidróxido de sodio (NaOH) y sulfuro de sodio (Na_2S), llamada licor blanco, para separar la lignina de la celulosa; la cual después de la cocción se lava con agua, se clasifica, espesa, limpia y almacena para su posterior blanqueamiento. (Lossada, Formento, Adell, & Mina, 1982)

1.2. Blanqueamiento.

La principal razón del blanqueamiento de la pulpa es la eliminación de la lignina residual, para mejorar la calidad de la fibra, ya que la lignina produce una coloración marrón en el papel final.

En esta etapa se le otorga a la pulpa la blancura que corresponde según los estándares establecidos para su comercialización. El blanqueo corresponde a un tratamiento químico en etapas sucesivas y bajo condiciones de operación distintas.

Los principales reactivos químicos utilizados son cloro elemental (Cl_2), dióxido de cloro (ClO_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidróxido de sodio en algunas etapas de blanqueo, para facilitar la extracción del material disuelto. (U.S.A Patente nº 3.470, 061, 1969). Este proceso provoca que se pierdan las regiones amorfas y se obtienen solamente largas cadenas de celulosa cristalina, la cual se condensa para formar un masa se le agregan biosidas, polipropileno o polietileno, que le dan características especiales, posteriormente se seca y endurece para generar grandes láminas de papel. (SCA, 2010)

1.3 Celulosa

La celulosa es una sustancia incolora, insoluble en agua y en la mayor parte de los solventes orgánicos, es el componente principal de las paredes celulares vegetales, y se asemeja estructuralmente al almidón. (Beyer & Wolfgang, 1987)

La estructura de la celulosa es una cadena lineal de unidades de glucopiranosas unidas entre sí por enlaces β -glucosídicos entre el carbono 1 de una unidad y el grupo hidroxilo del carbono 4 de otra unidad. (**Figura 1**)

Es decir consiste en largas cadenas de anillos de seis eslabones en la conformación de silla más estable, con todos los sustituyentes voluminosos en las posiciones ecuatoriales

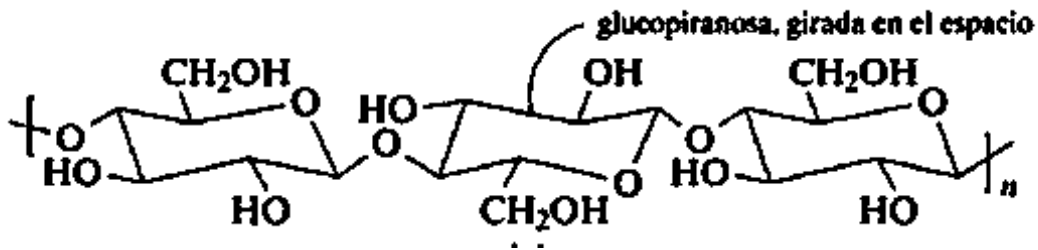


Figura 1 Estructura química de la celulosa (Ege 2004)

En la naturaleza la celulosa es sintetizada como moléculas individuales (cadenas lineales de residuos glucosídicos) que se ensamblan como polisacárido en el sitio de biosíntesis. (Brown R. M., 2000). La celulosa se sintetiza en la superficie externa de la membrana plasmática. Es posible que los nucleótidos de azúcares GDP-glucosa y UDP-glucosa que se forman en el citoplasma, se sitúan en la periferia de la celulosa cerca de la membrana donde se localiza la enzima celulosa-sintasa. (Sandoval-Z., 2005) El polisacárido de celulosa está localizado en la pared celular donde se encuentra como unidades sub-microscópicas de forma alargada conocida como micelas. A su vez, estas micelas se arreglan en estructuras más grandes, las microfibrillas, las cuales están suficientemente empaquetadas para prevenir la penetración no sólo de enzimas sino de pequeñas moléculas semejantes al agua. (Lynd, Weimer, Van Zyl, & Pretorius, 2002)

Una importante característica de la celulosa, relativamente inusual de los polisacáridos es su estructura cristalina, sin embargo, las fibras individuales no son puramente cristalinas, lo que genera regiones amorfas (**Figura 2**) donde las fibras contienen torceduras y espacios en sus microfibrillas lo cual permite la formación de micro poros y capilares lo suficientemente espaciosos para permitir la penetración de moléculas relativamente grandes incluyendo, en algunos casos enzimas celulolíticas (Stone, 1968)

Las microfibrillas de celulosa están estabilizadas por enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares y rodeadas por polisacáridos hemicelulósicos (manano y xilano) que se unen a la celulosa por puentes de hidrógeno y enlaces covalentes, los cuales la hacen extremadamente resistente a la hidrólisis química y biológica. Así mismo,

las regiones amorfas de la estructura cristalina de la celulosa tienen una composición heterogénea caracterizada por una variedad de enlaces. Finalmente este arreglo asimétrico que caracteriza las regiones amorfas es crucial para la biodegradación de la celulosa

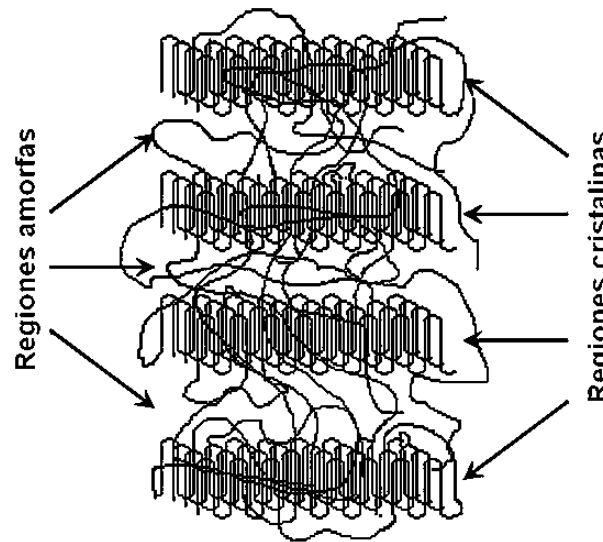


Figura 2 Estructura de las regiones amorfas y cristalinas en las cadenas de celulosa (Stone 1968)

2. COMPONENTES DE LA TINTA PARA IMPRESIÓN Y SUS EFECTOS SOBRE LOS MICROORGANISMOS.

2.1. Composición química de la tinta para impresora

Se puede definir la tinta de manera general, como un fluido compuesto por un vehículo que transporta pigmentos y aditivos, capaz de mantenerse como tal en un cuerpo impresor y que cambia a estado sólido en contacto con el sustrato (papel). En el que el pigmento representa solo el 10% de la composición total.

Actualmente las tintas desarrolladas para las impresoras de inyección de tinta caseras y de oficina tienen una base acuosa, y cumplen con parámetros específicos de color, pH, viscosidad, tensión superficial, pureza y estabilidad.

En cuanto a la composición química esta es principalmente con una base de agua desionizada y dietilenglicol, alcohol isopropílico y etilenglicol (co-solventes) que son la base en la composición química de las tintas.

Los otros compuestos son el pigmento normalmente para la tinta negra es el Dicromato de Hierro II (FeCr_2O_7), sustancias surfactantes, buffers para mantener el pH y otros agentes.

En cuanto a la inhibición del crecimiento de microorganismos de hongos y bacterias se utiliza principalmente Clorometilisotiazolinona y Metilisotiazolinona en proporción (3:1). Y al entrar en contacto con el papel forma cristales que actúan como biocida aún después de secada la tinta cuya acción es de casi un 100% de efectividad aún pasados 12 meses del secado inicial.

2.2. Efecto de la tinta sobre hongos y bacterias.

El efecto biocida sobre hongos y bacterias específico de la tinta se debe a que la mezcla de isotiazolinonas actúa siguiendo el mecanismo de acción de las sulfonamidas.

Esta actividad es debida a su mecanismo competitivo frente al ácido para-aminobenzoico, el cual no puede transformarse en ácido dehidrofólico en el interior de las bacterias inhibiendo el metabolismo de purinas y por lo tanto el crecimiento bacteriano. En los hongos actúa evitando la fosforilación de los ácido nucleicos. (Genaro, 2003)

3. DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA

Los procesos biológicos se llevan a cabo en gran medida por reacciones catalizadas por proteínas que se conocen como enzimas. De manera general, las enzimas presentan las siguientes características:

- Son muy específicas
- La velocidad de reacción es de dos a tres órdenes de magnitud mayor que la de los catalizadores inorgánicos.
- Las condiciones de reacción, temperatura y presión relativamente bajas, hace que su uso sea poco costoso.
- Se pueden producir de manera artificial fácilmente y en gran cantidad mediante técnicas genéticas.

- Se pueden realizar reacciones de síntesis en varios pasos

Una de las características más sobresalientes de la catálisis enzimática es el alto grado de especificidad de la enzima por el o los sustratos de la reacción. Esta especificidad se limita a una sola molécula o a un rango muy restringido de sustancias químicamente relacionadas con ellas. (Warren, 1996)

Existe una notoria estero-especificidad en las enzimas que incluye la capacidad de distinguir entre dos sustratos con grupos funcionales aparentemente idénticos colocados en una molécula asimétrica; las enzimas son capaces de seleccionar solamente uno de los isómeros ópticos de una mezcla, la unión de la enzima con el sustrato requiere de la participación de un mínimo de tres grupos residuales de la cadena peptídica para la debida orientación del sustrato.

3.1. Clasificación de la Glucosil Hidrolasas

Las glucosil hidrolasas constituyen un grupo muy amplio y variado de enzimas cuya característica común es la capacidad de hidrolizar el enlace glicosídico que forma el eslabón de enlace de los azúcares. Al igual que el resto de las enzimas, las glucosil hidrolasas se clasifican siguiendo las recomendaciones originalmente establecidas por el "Nomenclature Committee" de la "International Union of Biochemistry" IUB, posteriormente adoptada por otras organizaciones bioquímicas internacionales como la IUBMB. (Henrissat B. , 1991) Esta clasificación establece un catálogo de enzimas (Enzyme Catalog EC) que asigna a cada enzima un código numérico basado en el tipo de reacción catalizada y en la especificidad de sustrato. Las glucosil hidrolasas son definidas como (EC.3.2.1.x), donde los tres primeros dígitos indican la propiedad de hidrolizar el enlace O-glucosídico y el cuarto (x) indica el tipo de sustrato. (Henrissat, 1990) Aunque esta clasificación es de gran utilidad no aporta información sobre aspectos muy importantes de las enzimas como son su estructura molecular y sus relaciones filogenéticas. Para suplir estas limitaciones, se han establecido una clasificación complementaria a la anterior, basada en la similitud de sus secuencias de aminoácidos. (Henrissat y Bairoch, 1996)

Las familias 5 y 10 incluyen enzimas presentes en bacterias, hongos y plantas, no todas las enzimas clasificadas en estas familias son celulasas; hay muchas enzimas con otro tipo de actividad. El hecho de que enzimas pertenecientes a una misma familia, homólogas en secuencia y por tanto con estructura tridimensional parecida, sean activas frente a sustratos distintos, como son la celulosa y el xilano, se explica por la relación estructural existente entre estos dos polisacáridos. Si bien la unidad monomérica es distinta en uno y otro caso: como una hexosa (glucosa) en la celulosa y una pentosa en la xilosa, en el xilano, los sucesivos enlaces β -glucosídicos que constituyen ambos polisacáridos se estructuran espacialmente de forma similar.

3.2. Enzimas implicadas en la degradación de celulosa

El mecanismo ampliamente aceptado para explicar la hidrólisis enzimática de la celulosa involucra la acción enzimática de tres enzimas: la endo β -1,4 glucanasa, la exo β -1,4 celobiohidrolasa y la β -1,4 glucosidasa. (Henrissat, Vigny, Buleon, & Perez, 1988). La endo β -1,4 glucanasa hidroliza aleatoriamente los enlaces β -1,4 glucosídicos intramoleculares accesibles de cadenas de celulosa para producir oligosacáridos de varias longitudes. La exo β -1,4 celobiohidrolasa corta los extremos no reductores del sustrato generando unidades de celobiosa o glucosa y por último la β -1,4 glucosidasa, completa el proceso hidrolítico convirtiendo los fragmentos de celobiosa a glucosa o removiendo glucosa desde los extremos no reductores de pequeños celoligosacáridos. (Ohmiya, Sakka, Kimura, & Karita, 1997)

3.3. Endoglucanasas

Las endoglucanasas actúan al azar sobre los enlaces β -1,4 glucosídicos y su actividad es con frecuencia medida sobre celulosa soluble con alto grado de polimerización, como es el caso de la carboximetilcelulosa CMC. La acción de las endoglucanasas sobre este sustrato celulósico se caracteriza por la disminución de la viscosidad realizando cortes intramoleculares. (Benoit, y otros, 1995) Además la tasa de hidrólisis está condicionada a la habilidad de las endoglucanasas para actuar en las regiones amorfas de la matriz cristalina de la celulosa y crear nuevos

extremos reductores en los cuales las exoglucanas puedan actuar. (Malherbe & Cloete, 2002)

Las exoglucanasas que incluyen 1,4- β -D-glucán-glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4). Actúan en las porciones amorfas de las fibras de celulosa y rompen los enlaces β -1,4-glucosídicos generando oligosacáridos de distintas longitudes. (Castillo-Rodríguez, 2005)

La medida de la actividad de endoglucanasa puede ser basada en la reducción de la viscosidad del sustrato y/o en el incremento de azúcares reductores que se determinan por técnicas que permitan medir azúcares reductores. Sin embargo, la actividad de las exoglucanasas también incrementa el número de azúcares reductores por lo cual, es recomendable que la actividad de las endoglucanasas sea medida por ambos métodos viscosidad y azúcares reductores. (Watnabe & Tokuda, 2001)

Por otro lado, dicha actividad puede ser fácilmente detectada en medios con CMC o celulosa y adición de varios colorantes como el rojo Congo, debido a que estos son adsorbidos solo por largas cadenas de polisacáridos. Este método es semi-cuantitativo y muy adecuado cuando se requiere procesar un gran número de muestras. (Thether & Wood, 1982)

3.4. Exoglucanasas

Las exoglucanasas que incluyen 1,4- β -D-glucosil hidrolasas (celodextrinasas EC 3.2.1.74) y 1,4- β -D-glucán-celobiohidrolasas (celobiohidrolasas EC 3.2.1.91). Las exoglucanasas cortan los extremos accesibles de la molécula de celulosa para liberar glucosa y celobiosa. (Castillo-Rodríguez, 2005)

3.5 β - glucosidasas

La β -glucosidasa o β -glucosido glucohidrolasas (E.C 3.2.1.2.1) hidrolizan las unidades de celobiosa soluble y otras celodextrinas con un grado de polimerización superior a 6 y la posterior producción de glucosa. La tasa de hidrólisis disminuye con el incremento en el grado de polimerización del sustrato. (Castillo-Rodríguez, 2005)

Estos tres sistemas actúan de forma cooperativa en la degradación de la celulosa. Las celulasas se distinguen de otras glucosil hidrolasas, por la acción de hidrólisis de las uniones β -1,4-glucosídicas.

Tabla 1 Resumen de las enzimas implicadas en la hidrólisis de celulosa por su sitio de acción y productos generados

Nombre	Sitio de Acción	Residuos o elementos liberados
Endo β-1,4-glucanasa	Actúa al azar sobre los enlaces β -1,4 glucosídicos de la celulosa de las zonas amorfas	Oligosacáridos
Exo-β-1,4-celobiohidrolasa	Corta la cadena 1,4 β -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, su acción activa la acción de otras enzimas	Celobiosa/ 2 moléculas de glucosa unidas por un enlace β -1,4
β-1,4-glucosidasa	Actúa sobre los enlaces β -1,4 de la celobiosa liberada por las exocelulasas liberando moléculas libres de glucosa	Glucosa
1,4-β-D-glucán--glucanohidrolasa	Actúa en los extremos reductores de la celulosa	Libera moléculas de glucosa libre
1,4-β-D-glucosilhidrolasa	Hidrolizan las unidades de celobiosa e monómeros de glucosa	Glucosa y Celobiosa
1,4-β-D-glucancelobiohidrolasa	Corta los enlaces β -1,4 de los oligosacáridos	Genera unidades de celobiosa
β-glucosidasa	Enlaces β 1,3 y 1,4 de la celobiosa soluble	Glucosa

3.6 Represión Catabólica

Este término fue acuñado en 1961 por Magasanik para describir el comportamiento de una célula incubada en presencia de más de una fuente de carbono. (Sánchez & Farrés, 1987) Las enzimas que toman parte en la utilización de los carbohidratos se podrían formar simultáneamente; sin embargo, solamente se produce un sistema enzimático y una vez que una de las fuentes de carbono se ha consumido, se forma el sistema que permite la utilización de la siguiente.

3.7. Retrorepresión

Puede definirse como la inhibición en la síntesis de una o varias enzimas de una vía metabólica, como respuesta a la presencia del producto final de biosíntesis o de un derivado del mismo (co-represor) en concentraciones importantes. Para ello un gen regulador produce una proteína represora inactiva (apo-represor), que puede ser activada por el co-represor específico. El represor activado bloquea el gen operador, previniendo así la transcripción del gen estructural.

4. MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS

Los microorganismos degradadores de celulosa incluyen hongos y bacterias, aerobios y anaerobios, mesófilos y termófilos que ocupan una variedad de hábitats. Entre los hongos celulolíticos se destacan: *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Sporotrix sp.*, *Alternaria sp.*, *Geotrichum sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Trametes sp.*, *Paecilomyces sp.*, *Mucor sp.*, *Cladosporium sp.*, *bulgaris sp.*, *Chaetonium sp.*, *Helotium sp.*, *Aspergillus sp.* Las bacterias celulolíticas más abundantes y conocidas son las aerobias entre las cuales se pueden citar: *Cellulomonas sp.*, *Microbispora bispora*, *Thermomonospora sp.*, *Cytophaga sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Vibrio sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Thermobifida sp.* Además se encuentran algunos anaerobios como *Acetovibrio cellulolyticus*, *Butivibrio sp.*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Bacteroides succinogenes*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavenfaciens*. (Lynd, Weimer, Van Zyl, & Pretorius, 2002)

4.1. Fisiología de los organismos celulolíticos.

En general los microorganismos celulolíticos no son especialistas en la degradación de la celulosa. Primordialmente son microorganismos degradadores de carbohidratos y son incapaces de degradar proteínas o lípidos, como fuente de energía para su crecimiento. Habitualmente utilizan una gran variedad de carbohidratos además de la celulosa. (Poulsen & Petersen, 1988).

La naturaleza especializada de los microorganismos celulíticos, es probablemente el resultado de la maquinaria enzimática especializada para la hidrólisis de celulosa, el esfuerzo metabólico significativo dedicado a su síntesis, y otras características peculiares para la utilización de la celulosa. Estas características, junto con el alto valor calórico y la abundancia en la naturaleza de la propia celulosa, aplican una presión selectiva significativa sobre los microorganismos para su utilización, particularmente si el organismo desarrolla una estrategia para posicionarse de tal manera que pueda obtener un acceso privilegiados a los productos de hidrólisis de celulosa. Un microorganismo especializado, suficientemente bien adaptado a la utilización de celulosa, puede subsistir prácticamente en cualquier ambiente o hábitat, siempre y cuando tenga acceso a biomasa vegetal u otra fuente de celulosa como el papel. (Lynd, Weimer, Van Zyl, & Pretorius, 2002)

Los requerimientos nutricionales para el crecimiento de las especies celulolíticas incluye la disponibilidad de nitrógeno, fósforo, y azufre, además de varios minerales a distintas concentraciones, así como diversas vitaminas.

4.1.2 Celulosoma

Los celulosomas son complejos multi enzimáticos cuyos componentes actúan de manera sinérgica para hidrolizar a la celulosa. (Bayer, Kening., & Lamed, 1994) Inicialmente dicho complejo fue descrito como un factor antigénicamente activo que se une a la celulosa y que se localiza en la superficie de la célula. Los celulosomas funcionan como estructuras exocelulares especializadas, que catalizan la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa (Bayern, 1998). En general tres tipos de enzimas forman los sistemas celulolíticos: endocelulasas, exocelulosas y β -D-glucosidasas, como se mencionó anteriormente.

4.1.2.1 Estructura del Celulosoma.

El celulosoma se ha descrito como uno de los sistemas enzimáticos más complejos. Este está constituido por múltiples cadenas poli peptídicas cuyo número varía de un

organismo a otro e incluso difiere entre cepas. El número exacto de poli péptidos no se conoce porque algunos de ellos producen múltiples bandas en geles de electroforesis, dependiendo de la asociación con otros poli péptidos y a su contenido de carbohidratos o materiales no proteicos. (Béguin, 1996)

Las enzimas celulosomales son muy parecidas a la celulasas libres. Ambas contienen dominios catalíticos similares; la principal diferencia estriba en que las celulasas celulosomales tienen un dominio de anclaje, el cual ayuda a la integración de la enzima dentro del complejo celulosómico, mientras que las celulasas libres no lo tienen.

En bacterias, el dominio de anclaje consta de 70 residuos que se caracterizan por tener una región de 22 residuos conservados. Por otra parte en enzimas presentes en un hongo ha sido descrito un dominio de anclaje que comprende una secuencia conservada de 40 aminoácidos. Estas secuencias conservadas tienen un motivo que une al calcio. En el caso de las celulasas que no forman parte de los celulosomas, en lugar del dominio de anclaje, tienen un dominio de unión a celulosa (DUC).

Los diferentes dominios que componen al complejo biológico están conectados por péptidos de enlace. Estos segmentos son frecuentemente, aunque no siempre, ricos en residuos de prolina y treonina y/o serina y están generalmente glicosilados. Las subunidades que forman el complejo biológico celulosómico están organizadas por su interacción con una subunidad estructural especializada (scaffolding). (Ding, 2001) La estructura del celulosoma es muy estable, flexible y la interacción con el sustrato parece implicar un cambio conformacional.

4.2. Adhesión y formación del complejo enzimático de los microorganismos celulolíticos aerobios.

El catabolismo de la celulosa incluye tanto la hidrólisis de la celulosa insoluble, como la utilización de los productos de hidrólisis por los microorganismos. Hay dos estrategias principales en la utilización de la celulosa. Las bacterias aeróbicas y los hongos, no se adhieren a la celulosa o lo hacen débilmente, producen celulasas que no forman complejos biológicos (celulasas libres) e hidrolizan y oxidan la celulosa

hasta CO₂ y agua. (**Figura 3**) Sin embargo hay hongos que tienen la tendencia a adherirse a la celulosa produciendo un complejo biológico entre la celulosa y el celulosoma; estos también son capaces de hidrolizar la celulosa de igual manera que los microorganismos anaerobios, para utilizarla por vías de catabolismo aerobio.

La hidrólisis de celulosa necesita en primer lugar, la unión de las enzimas implicadas al sustrato, ya sea como un complejo binario enzima-sustrato o como un complejo ternario celulosa-enzima-microorganismo, es decir la formación del celulosoma. (Wang, Zu, & Gao, 1996) (Félix & Ljungdahl, 1993) Algunas células con sistemas celulóliticos simples muestran una tendencia a adherirse a la celulosa, aunque tal contacto no parece ser necesario para la utilización de esta. (Kauri & Kushner, 1985) En los hongos observamos que, durante la degradación de las paredes celulares de la planta, en el medio ambiente, las hifas de los hongos están confinadas en los espacios intercelulares, entre una célula vegetal y otra, donde se encuentran en estrecha proximidad al sustrato, incluso si no están estrictamente adheridos, en este ambiente confinado, la pérdida de enzimas hidrolíticas y de productos de degradación es limitado. (Tengerdy, Rho, & Mohagheghi, 1991) (Fan, Lee y Beardmore, 1980)

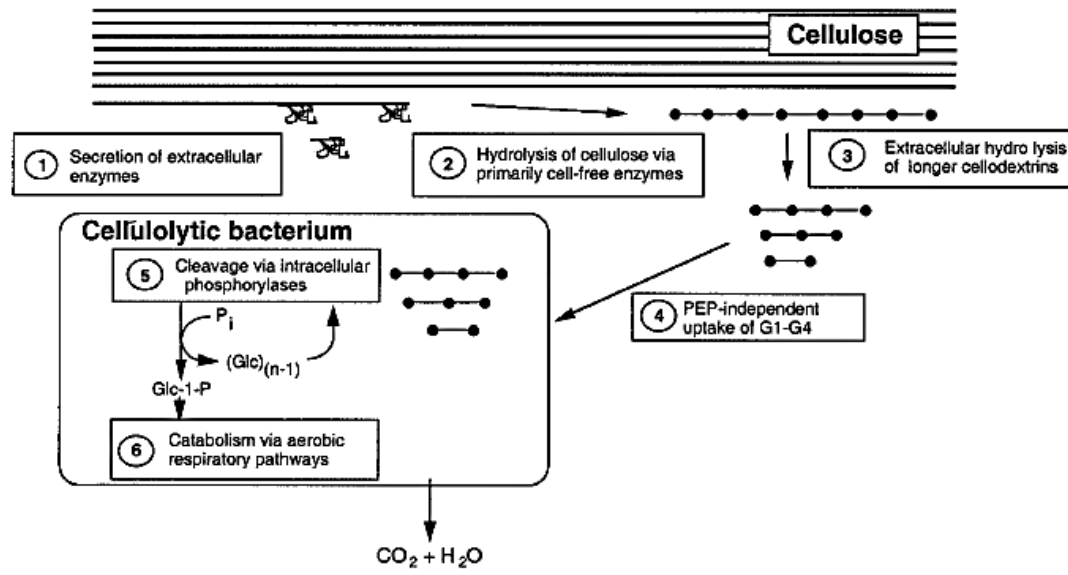


Figura 3 Mecanismo general de la degradación de celulosa por bacterias anaerobias y hongos (Kauri y Kushner 1985)

4.3. Adhesión y formación de complejos enzimáticos de los microorganismos celulolíticos anaeróbicos.

Para las especies de bacterias anaerobias, la adhesión a la celulosa, mediante el celulosoma, es mucho más común que para las bacterias y otros organismos aeróbicos y para algunas especies parece ser un requisito para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa rápida y eficiente. (**Figura 4**) (Wachinger, Bronnenmeier, Staudenbauer, & Schrempf, 1989)

Durante las primeras etapas de crecimiento, las colonias se encuentran en estrecho contacto con la celulosa, y la adhesión ha sido explicada por la presencia de ligandos de unión a la celulosa presentes en el complejo del celulosoma, que se anclan a la celulosa a través del dominio de cohesión en el extremo carboxilo del sitio de unión a proteínas. (Bayer, Kening, & Lamed, 1983)

Algunas bacterias anaeróbicas producen una serie de proteínas de unión a celulosa con actividad de endoglucanasa y una delgada capa de glicocalix que resulta en una fuerte adhesión a la celulosa. (Kudo, Cheng, & Costerton, 1987)

Por lo tanto la adhesión parece ser una estrategia importante para la utilización de la celulosa entre las bacterias anaeróbicas, y el complejo ternario celulosa-enzima-bacteria es probablemente el principal agente de celulolisis. (Lynd, Weimer, Van Zyl, & Pretorius, 2002)

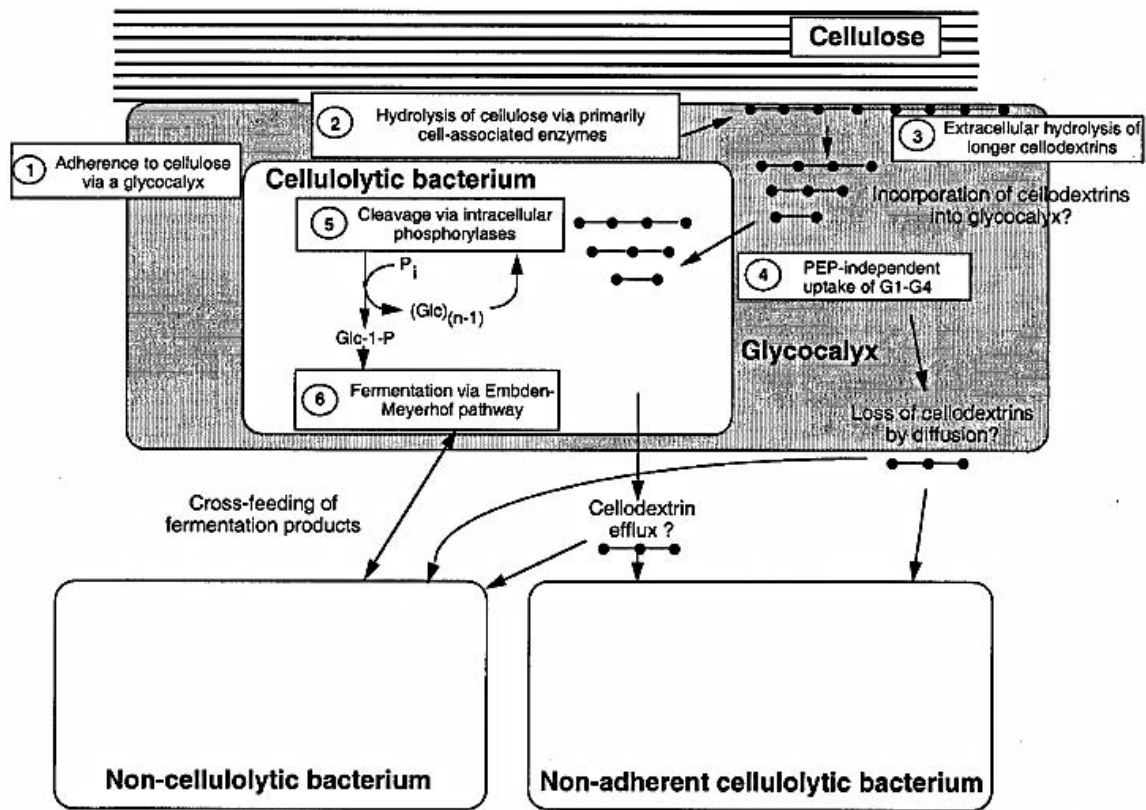


Figura 4 Mecanismo general de la degradación de la celulosa por bacterias anaerobias (Kauri y Kushner 1985)

El mecanismo general de adhesión en el punto de contacto con la celulosa ha sido identificado en diversas especies aerobias y anaerobias. (Miron, Ghedalia-Ben, & Morrison, 2001). Este incluye; i) El celulosoma ii) Proteínas de unión a celulosa no catalíticas. iii) Fracciones glicosiladas del glicocalix bacteriano o proteínas de unión específicas. iv) Fimbrias o estructuras similares a pilis.

Se ha implicado la participación de una molécula específica dentro de las especies celulolíticas, pero en muchos casos la evidencia es indirecta y basada en la determinación de la secuencia de un gen similar a estos componentes de adhesión en otras especies. (Uozomi, Hayashi, Ito, & all, 1993)

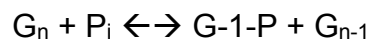
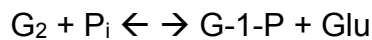
4.4. Captación y fosforilación de los productos de la hidrólisis de la celulosa.

La fuerza impulsora para la captación de glucosa y sus oligómeros parece variar entre las especies celulolíticas, aunque no existe hasta la fecha ninguna evidencia de la participación clásica del sistema de fosfotransferasa o fosfoenolpiruvato dependiente.

En los distintos microorganismos la captación de celobiosa y celodextrina, productos de la hidrólisis inicial de la celulosa llevada a cabo por los complejos binarios y ternarios, depende de un sistema dependiente de ATP que es común para ambos polímeros, mientras que la glucosa entra a través de una vía separada que también es dependiente de ATP. (Strobel, Caldwell, & Dawson, 1995)

Los microorganismos celulolíticos poseen celodextrinasas extracelulares que hidrolizan celodextrinas, así como celobiofosforilasas y celodextrinfosforilasas intracelulares que catalizan reacciones de fosforilación mediadas por fosforo inorgánico.

Proceso general de la hidrólisis de la Glucosa



Las celobiofosforilasas se encuentran ampliamente distribuidas tanto en microorganismos aerobios como anaerobios, así como en microorganismo hipertermófilos tales como *Thermotoga neopolitna*. (Yernool, McCarthy, Eveleigh, & Bok, 2000) En contraste la distribución de la celodextrinfosforilasa no ha sido totalmente investigada pero se han aislados y purificado estas enzimas de la bacteria *C. thermocellum* (Lynd, Weimer, Van Zyl, & Pretorius, 2002)

Una o más β -glucosidasas intracelulares que son capaces de hidrolizar celobiosa y/o celodextrina han sido detectadas en distintos microorganismo celulolíticos. (Weimmer, Hackney, & French, 2000)

La presencia simultánea de celodextrinasas extracelulares, la actividad de las celobiofosforilasas y celodextrinfosforilasa intracelulares y las β -glucosidasas intracelulares en diversas especies celulolíticas, sugiere que el metabolismo de la celodextrina y la celobiosa está compuesta por diferentes procesos: i) hidrólisis extra citoplasmica, con la posterior absorción y catabolismo, ii) absorción directa de los oligosacáridos, la fosforilación intracelular y catabolismo de los mismo, y iii) la absorción directa de los oligosacáridos, la ruptura de enlaces para formar moléculas más pequeñas o glucosa libre y el posterior catabolismo. (Lynd, Weimer, Van Zyl, & Pretorius, 2002)

Las celobiofosforilasas no pueden romper moléculas con más de 3 glucosas y las celodextrinfosforilasas no pueden romper los enlaces de moléculas con sólo dos glucosas unidas, algunos datos sugieren que las celobiofosforilasas juegan un rol más importante durante la etapa de adaptación y crecimiento de los microorganismo en celulosa a pesar de que su uso proporciona una ganancia neta de ATP más baja comparada con las celodextrin-fosforilasas.

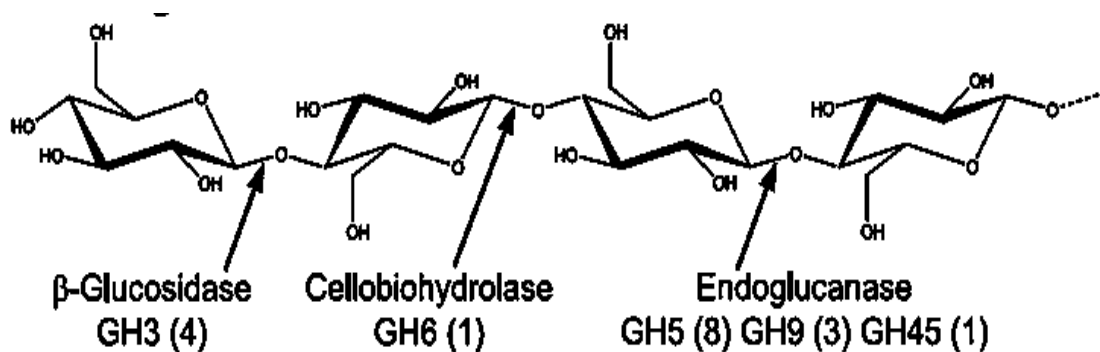


Figura 5 Ejemplos de los sitios de acción de las enzimas celulolíticas en las cadenas de celulosa.

5. FACTORES QUE DETERMINAN LA DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA.

Para la hidrólisis enzimática de la celulosa presente en la naturaleza, se han propuesto muchos factores determinantes, que tienen que ver tanto con la anatomía de los microorganismos como la naturaleza de la celulosa o bien las condiciones ambientales incluyendo la cristalinidad, grado de polimerización, tamaño de la partícula, el volumen de los poros y acceso a la celulosa. (Fan, Yong-Hyun, & Beardmore, 1980)

5.1 Estructura de la celulosa

Una de las consecuencias de la variabilidad en la estructura de la celulosa es que es imposible obtener una población de partículas de celulosa con idénticas características. (Gama, Teixeira, & Mota, 1994)

Cuando se altera una de las características de la celulosa por medios físicos o químicos para obtener ciertas características como en el tratamiento para producir papel bond se ven afectadas directamente otras características. Por ejemplo cuando se realiza un tratamiento para aumentar las zonas amorfas de la celulosa, el grado medio de cristalinidad se ve reducido. (Focher, Marzetti, Cattaneo, Beltrame, & Carniti, 1981)

La cristalinidad de la celulosa es considerada como uno de los factores más determinantes en la hidrólisis de la celulosa tanto a nivel enzimático como microbiano. El pretratamiento de la biomasa de celulosa que reduce la cristalinidad generalmente mejora la hidrólisis de la celulosa por celulasas fúngicas. Estudios con celulosa pura indican que las regiones amorfas de la celulosa se degradan de 5 a 10 veces más rápido que aquella que presenta una alta cristalinidad, utilizando las mismas celulasas fúngicas. Sobre esta base, podemos esperar que la cristalinidad debe aumentar durante el curso de la hidrólisis de la celulosa como resultado de la eliminación a mayor velocidad de las zonas amorfas. (Gamma, Teixeira, & Mota, 1994)

5.2. Factores ambientales que actúan sobre los microorganismos celulolíticos.

La tasa a la cual se metaboliza la celulosa está dada por varios factores del medio ambiente, y los suelos que varían en sus características físicas y químicas poseen marcadas diferencias en su capacidad celulolítica. Los principales factores del medio ambiente que afectan la formación son el nivel de nitrógeno disponible, la temperatura, concentración de oxígeno, humedad, pH, la presencia de otros carbohidratos en el medio. (Hoeniger, 1985)

5.2.1 Concentración de Nitrógeno en el suelo.

La aplicación de nitrógeno inorgánico aumenta la descomposición de la celulosa en el suelo y tanto las sales de amonio como las de nitrato son buenas fuentes de este elemento. La respuesta a éste indica que el nivel de nitrógeno en el suelo es un factor limitante. (Alexander, 1980)

5.2.2 Temperatura

La utilización biológica de la celulosa puede llevarse a cabo desde temperaturas cercanas a la congelación hasta alrededor de los 65°C. Cada una de las variedades de organismo celulolíticos es afectada en forma diferente por la temperatura. Los mesófilos dominan en temperaturas moderadas, mientras que la microflora termófila puede degradar la celulosa por arriba de los 45°C. Debido a los cambios en la composición de la flora inducidos por la temperatura, el calor aumenta la velocidad de transformación del sustrato a causa del efecto directo de ésta sobre la acción enzimática. (Alexander, 1980)

5.2.3 Oxigenación

Los niveles de oxígeno también rigen la composición de la flora activa en determinadas zonas. A causa del proceso anaeróbico, el metabolismo de la celulosa es reducido significativamente en medios deficientes de oxígeno en comparación con hábitats más oxigenados. (Alexander, 1980)

5.2.4 pH

En medio con pH entre neutro y alcalino, muchos microorganismos son capaces de crecer y liberar las enzimas apropiadas para la hidrólisis de la celulosa; bajo condiciones ácidas la desaparición de la celulosa se debe principalmente a los hongos filamentosos. Aunque el proceso es rápido a pH menor de 5 y ocasionalmente por debajo de 4. (Amartey, Leak, & Hartley, 1991)

5.3. Factores que determinan la Actividad enzimática de las celulasas.

Diversos factores asociados con la naturaleza del sistema enzimático de las celulasas ha sido sugerido por influenciar el proceso hidrolítico. Estos incluyen: inhibición del complejo de celulasas por el producto final, inactivación térmica, sinergismo e irreversible adsorción de las enzimas; teniendo estos últimos la mayor influencia en la tasa de degradación de la celulosa. (Mansfield & Mooney, 1999)

5.3.1 Sinergismo

EL sinergismo ocurre cuando la acción combinada de dos o más enzimas aumenta la tasa de acción sobre el sustrato respecto a la acción individual. Se han hecho estudios en los que se ha observado una actividad cooperada de las celulasas de *Trichoderma reseei* en el que las endoglucanasas actúan al azar a lo largo de las cadenas de celulosa generando sitios donde actúan las exoglucanasas las cuales liberan celobiosa como producto principal, una tercer enzima, la β -glucosidasa es necesaria para hidrolizar la celobiosa previniendo de esta manera la inhibición de las exoglucanasas por acumulación de producto y por tanto generando un aumento en la tasa hidrolítica. (Mansfield & Mooney, 1999)

5.3.2 Adsorción.

La hidrólisis de la celulosa difiere de otras reacciones enzimáticas en que el sustrato es insoluble y requiere una previa adsorción de la enzima al sustrato. La adsorción de las celulasas es facilitada por la presencia de dominios en el sustrato los cuales son susceptibles al clivaje proteolítico mediante uniones por fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno. Además dichos dominios cuentan con aminoácidos

aromáticos que confieren una especificidad adicional y estabilidad al complejo enzima-sustrato. (Mansfield & Mooney, 1999)

Existen dos teorías para explicar la interacción de los dominios con la celulosa. La primera se basa en que los dominios incrementan la concentración local de enzimas en la superficie de la celulosa, la segunda propone que los dominios son un instrumento que permite el rompimiento de cadenas de celulosa cristalina pero no de celulosa amorfa. (Mansfield & Mooney, 1999)

6. Productos de degradación de la celulosa y su utilidad industrial.

Las bacterias aerobias generalmente convierten la celulosa en dos productos principales: CO₂ y biomasa. O existen acumulaciones significativas de intermediarios carbonados y la concentración de ácidos orgánicos raramente alcanza un nivel apreciable. Por otro lado, en condiciones anaerobias las bacterias son incapaces de metabolizar completamente dicho sustrato, siendo los principales productos de acumulación, CO₂, CH₄, H₂, etanol y ácidos acético, fórmico, succínico, butírico y láctico. (Forero, 1986)

6.1 Aplicación de la glucosa a nivel industrial

La glucosa, por ser un producto que posee diferentes características, entre ellas ser edulcorante, preservativo de la humedad, inhibidor frente a levaduras y mohos, estabilizador de la viscosidad, etc., tiene gran aplicación en la industria farmacéutica y de alimentos. La característica reductora de la glucosa referida a la capacidad de su grupo carboxilo para reaccionar como tal, está directamente relacionado con la capacidad de formar colores, y aromas de tostado por la reacción con las proteínas. (Forero, 1986)

En la industria alimenticia es utilizada como excipiente en la elaboración de jarabes y grageas, hace parte de la formulación de algunos sueros orales, etc. Además actualmente se utiliza sobre todo en la producción de biocombustible, como una alternativa a los combustibles derivados del petróleo. (Forero, 1986)

7. Herramientas bioinformáticas.

La bioinformática se define como la intersección entre la biotecnología y las ciencias de la computación (informática) que ayudan a la comprensión de los procesos moleculares y genéticos fundamentales. (Teufel, Krupp, Weinmann, & Galle, 2006)

7.1 Bases de Datos

Los grandes proyectos de secuenciación de genomas han proporcionado una gran cantidad de información que debe ser gestionada de un manera eficiente y precisa para poderla analizar. Esta gran cantidad de información no podría ser analizada de manera manual por lo que para hacer eficiente este proceso se ha llegado a la gestión informática mediante el uso de bases de datos, aplicaciones y protocolos automáticos los cuales sirven para almacenar, organizar y analizar mediante sistemas computacionales y programas datos de información biológica y clínica. (Teufel, Krupp, Weinmann, & Galle, 2006)

Estas bases de datos incrementan la rapidez del análisis de secuencias tanto nucleotídicas como proteínicas; los datos generados de la secuenciación de diferentes genomas es almacenada en grandes bases de datos, siendo las tres principales la European Molecular Biology Laboratory (EMBL)/ European Bioinformatics Institute (EBI), el National Center for Biotechnology Information (NCBI, GenBank) y la DNA Database of Japan (DDBJ). Estos tres depósitos de información, trabajan conjuntamente, para intercambiar las diferentes secuencias que son almacenadas diariamente. Por otra parte, estas organizaciones han acordado sobre una terminología común, por lo que la información de secuencia y los archivos son altamente compatibles entre las tres bases de datos. (Teufel, Krupp, Weinmann, & Galle, 2006)

7.2 Alineación de Secuencias

Los programas para llevar a cabo la alineación de secuencias y su comparación son herramientas esenciales en el análisis bioinformático, hoy en día las herramientas más utilizadas son aquellas que utilizan algoritmos que facilitan el alineamiento de las secuencias como BLAST y Clustal W.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es una herramienta diseñada para llevar a cabo la comparación entre secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, entre los contenidos en las bases de datos del NCBI, identifica las regiones de alta similitud. (NCBI, 2014)

La comparación de las secuencias nucleotídicas o de aminoácidos es otra de las herramientas utilizadas en bioinformática, esta permite inferir la función de los genes recién secuenciados o predecir la función de nuevos genes y explorar las relaciones evolutivas. También permite realizar una búsqueda de las secuencias similares a la secuencia de interés. (Jhonson, y otros, 2008)

Actualmente hay variaciones de BLAST, con las que podemos analizar secuencias de DNA con otra de DNA (blastn) o secuencias de nucleotídicas (blastx) así como secuencias de aminoácidos de distintos tamaños (blastp), entre otras. (Jhonson, y otros, 2008)

7.3 Otras herramientas bioinformáticas

Existen otros programas bioinformáticos para el diseño de oligonucleótidos para PCR o para diseñar sondas de hibridación, como Primer3 y MPprimer. Además hay programas como Oligo analyzer que ayudan a evaluar la especificidad y eficiencia de los oligonucleótidos. Estos programas consideran varios factores como la temperatura de fusión de oligonucleótidos, la longitud, su contenido de G-C, la estabilidad 3', la estructura secundaria prevista, la probabilidad de alineamiento o la amplificación de secuencias indeseables, la probabilidad de formación de dímeros entre dos copias de la misma imprimación y la exactitud de la secuencia de origen.

F) JUSTIFICACIÓN

El uso de microorganismo con capacidad celulolítica es ampliamente conocido y usado en diferentes industrias, sin embargo su uso está ampliamente enfocado a la descomposición de residuos orgánicos generados en la cosecha de diferentes cultivos y cuyo destino final es el compostaje y su uso en la nutrición de los suelos de cultivo, sin embargo su potencial va más allá del compostaje, siendo una de sus aplicaciones el uso de dichos microorganismos en el reciclaje de residuos sólidos del papel.

Actualmente el reciclaje del papel y sus derivados se enfoca en reutilizarlo para crear más papel, sin embargo el proceso para crear papel nuevo a partir de reciclado significa en sí mismo un impacto ambiental, ya que este debe de pasar por un nuevo proceso de blanqueado, lo que significa el uso de grandes cantidades de químicos, sin embargo conociendo el potencial de diversos microorganismo es posibles su uso en tratamiento de residuos de papel y sus derivados para no sólo utilizarlo para generar más producto, sino aprovechar los productos de su hidrólisis y utilizarse en diversas industrias, inclusive con el potencial de generar biocombustibles a partir de la identificación, aislamiento y fijación de las enzimas responsables de hidrolizar la celulosa del papel.

El presente trabajo pretende estudiar diversos microorganismos con capacidad celulolítica, así como realizar un análisis bioinformático de las enzimas responsables de llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa para generar Glucosa libre, la cual puede ser aprovechada en diversos procesos industriales y/o en la generación de biocombustibles que no dependan del uso de cultivos agrícolas.

G) OBJETIVOS

1. Objetivo General

Identificar microorganismos capaces de hidrolizar la celulosa contenida en el papel bond con tinta, así como llevar a cabo el análisis bioinformático de las posibles enzimas implicadas en la hidrólisis de celulosa.

2. Objetivos Particulares

- Aislar microorganismo con presunta actividad celulolítica de lugares con madera y hojarasca en descomposición para su identificación mediante pruebas bioquímicas y pruebas cuantitativas y cualitativas y su evaluación de la capacidad celulolítica.
- Realizar un análisis cualitativo de la actividad celulolítica de los diferentes microorganismos en agar Carboximetilcelulosa 1% revelado con rojo Congo.
- Cuantificar la glucosa producida a partir de la hidrólisis de la celulosa por curva de calibración espectrofotométrica con una reacción con ácido dinitrosalicílico DNS.
- Elaborar una cinética de crecimiento para observar las diferentes fases de cada microorganismo y determinar las fases de adaptación, crecimiento, mantenimiento y muerte.
- Realizar el análisis bioinformático de las enzimas implicadas en la hidrólisis de celulosa para identificar su estructura tridimensional, secuencia de aminoácidos, tamaño y gen que codifica para dicha secuencia.
- Evaluar la viabilidad del uso de la glucosa producida a partir de la hidrólisis de la celulosa contenida en el papel bond, para determinar si es factible su recuperación para su uso en procesos de fermentación

H) DIAGRAMAS DE TRABAJO

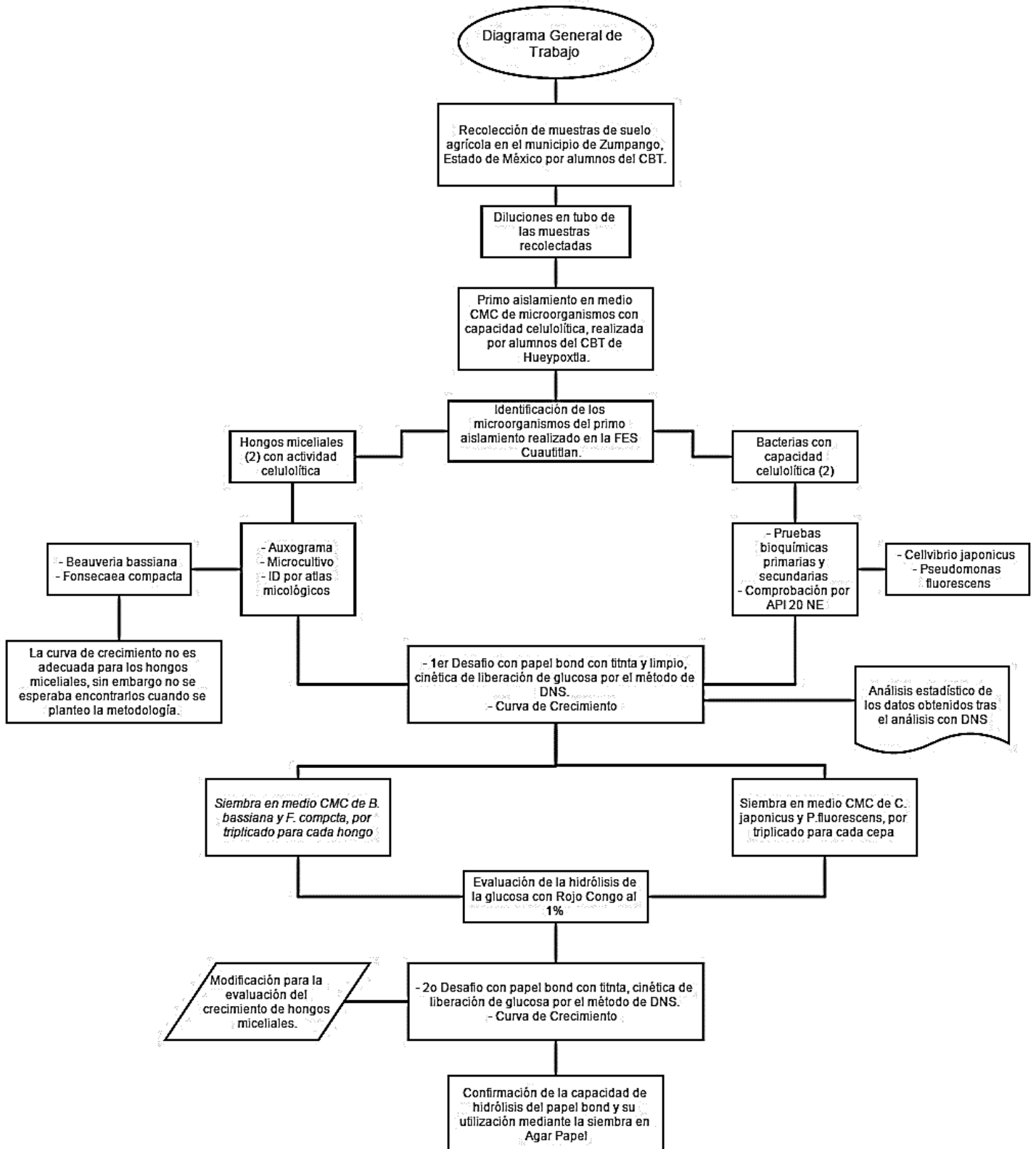
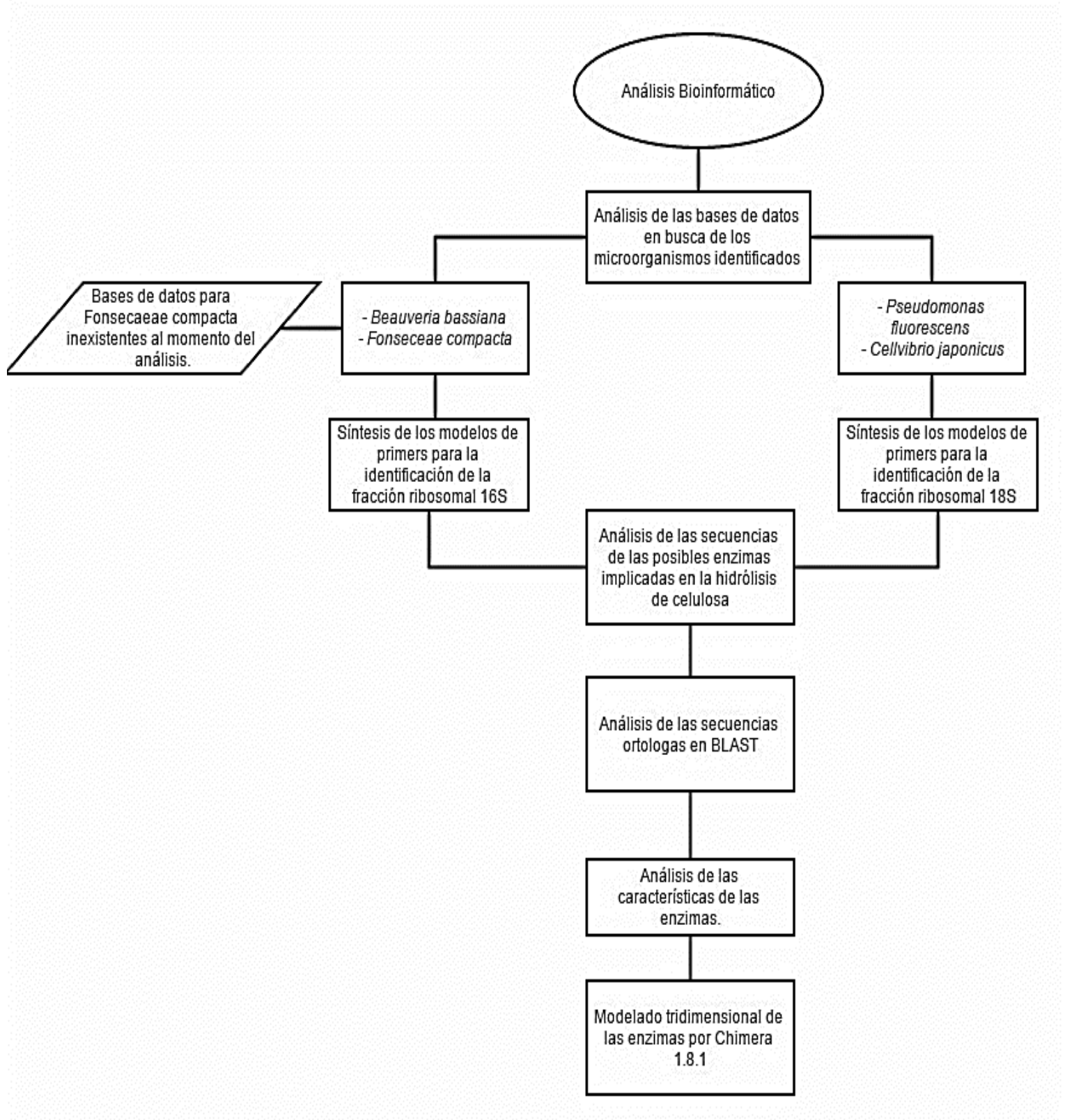


DIAGRAMA DE TRABAJO BIOINFORMÁTICA



I) METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó a partir de muestras seleccionadas y recolectadas como un proyecto de iniciación a la investigación de alumnos de nivel medio superior, los aislamientos iniciales y la primer evaluación cualitativa se realizaron por dichos alumnos, las consecuentes evaluaciones, aislamientos y purificación, identificación y análisis se llevaron a cabo como proyecto de tesis de licenciatura bajo la supervisión y asesoramiento de la M. en C Socorro Sandra Martínez Robles.

1. Recolección de muestras para el aislamiento de microorganismos con posible capacidad celulolítica, aislamiento primario y secundario y análisis cualitativo.

El muestreo de suelo con residuos vegetales en proceso de descomposición se llevó a cabo por los alumnos del CBT “Dr. Efraín Hernández Xolocotzi” del municipio de Hueyoptla, Estado de México; la selección de las zonas de muestreo se realizó en base a la observación de las características del terreno, en el cual se buscó que el suelo fuera homogéneo y que la cantidad de materia vegetal en descomposición fuera evidente; el muestreo de las zonas seleccionadas se realizó en forma de tablero de ajedrez, donde cada panel medía 4x4m y en las cuales se recolectaron 100 g de materia vegetal a 5cm de profundidad, del suelo a la superficie de la materia vegetal acumulada, la muestra se tomó en el centro de cada panel, y se almacenó en recipientes plásticos nuevos, la **Figura 5** ilustra en gris los paneles de los cuales se tomaron las muestras y el punto el centro de estos de donde se tomó la muestra.

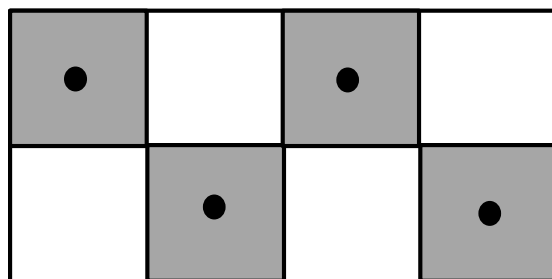


Figura 6 Muestreo en cuadrícula aleatoria de suelo agrícola

- **Aislamiento primario a partir de las muestras recolectadas.**

Se pesaron 10 g de muestra de suelo agrícola con materia orgánica en descomposición y se realizaron diluciones seriadas en tubos con solución salina fisiológica hasta llegar a la dilución 10^{-9} . A partir de las diluciones 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} y 10^{-9} , que se inocularon en medios de cultivo sólido que contenían como única fuente de carbono carboximetil celulosa 1% p/v disuelto en una solución de minerales de sulfato de amonio 0.5%; KH_2PO_4 0.1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, extracto de levadura 0.025% y agar 2%, se incubó a 25°C para tratar de recrear las condiciones de temperatura del suelo, por 24 a 48 horas.

- **Evaluación cualitativa de la actividad celulolítica.**

Una vez transcurrido el tiempo de incubación (72 horas para las bacterias y 120 horas para los hongos) se adicionaron 5mL de rojo Congo al 1% p/v a todas las cajas, transcurridos 15 minutos se decantó el colorante, y se enjuago con una solución de NaCl 0.1M y se dejó reposar por 15 minutos más, se decantó el exceso y se dejó secar. Una vez seco se observó que colonias tenían un halo claro alrededor de las zonas de crecimiento (hidrólisis), se seleccionaron aquellas colonias con el halo hidrolítico de mayor diámetro, las cuales se sembraron y evaluaron cualitativamente por triplicado con la metodología descrita.

2. Identificación bioquímica y microscópica de microorganismos con actividad celulolítica

Se realizaron tinciones de Gram para las bacterias aisladas y tinciones con azul de algodón para los hongos, ambos con actividad celulolítica confirmada mediante la prueba cualitativa de rojo Congo; las bacterias se inocularon, en una batería de pruebas bioquímicas primarias y secundarias proporcionadas por los laboratorios de microbiología de la FES Cuautitlán UNAM y su confirmación mediante la prueba de API 20NE. Se observó la morfología y características físicas de los hongos (color, crecimiento, textura, etc), así como las características microscópicas de las estructuras de reproducción con los objetivos de 10x y 40x.

Determinación de azúcares reductores

Se determinó la producción de glucosa a partir de papel bond con tinta contenido en un medio líquido, mediante la lectura espectrofotométrica a 540nm utilizando la técnica de DNS, ácido 3,5-dinitrosalicílico, durante 36 horas por intervalos de dos horas entre una lectura y otra, se calculó la concentración mediante el uso de una curva patrón y se llevó a cabo el análisis estadístico de los datos obtenidos, como blanco de lectura se utilizó ácido 3.5-dinitrosalicílico.

Curva de crecimiento de los microorganismos con actividad celulolítica

Se determinó el crecimiento de cada microorganismo en medio líquido Soya Trypticaseina, midiendo las absorbancias a 570 nm mediante los cambios en la turbidez del medio para posteriormente realizar las gráficas correspondientes del crecimiento exponencial, identificar cada fase del crecimiento y compararlas con la liberación de glucosa a partir de papel con tinta.

Debido a que la metodología se diseñó inicialmente para bacterias se realizó una adaptación para los hongos miceliales encontrados; el registro del crecimiento de estos se realizó a través de la medición del diámetro de crecimiento durante 192 horas.

Análisis *in silico* de las enzimas de los microorganismos con actividad celulolítica.

Los géneros y especies tanto de hongos como bacterias se identificaron por modelos de simulación bioinformática siguiendo el siguiente procedimiento.

Microorganismo

Bibliotecas consultadas y programas

Cellvibrio japonicus

Búsqueda de artículos en PubMed
Análisis de los genes en Genbank
Identificación de las secuencias de la enzimas implicadas

Pseudomonas fluorescens

Análisis de las secuencias ortólogas con microorganismo con actividad celulolítica confirmada.

Beauveria bassiana

Análisis de las características de la enzimas en UNIPROT y Structure.

Análisis de la probable localización subcelular en Softberry.

Modelado tridimensional de las enzima en Chimera 1.8.1

Fonsecaeeae compacta

No se encontraron datos referentes a *F Compacta* en las bases en línea, ya que la secuenciación del genoma de los hongos negros se empezó en Julio de 2014

I) RESULTADOS

Una vez obtenidas las muestras de suelos agrícolas, se procedió a sembrar dichas diluciones en agar CMC y seleccionar aquellas colonias que presentaron un halo de hidrólisis al revelarlas con Rojo Congo, todo ellos se realizó por alumnos del CBT “Dr. Efraín Hernández Xolocotzi”; inicialmente se esperaba encontrar solo bacterias y por ello la metodología se planteó para dichos microorganismos, sin embargo al momento de analizar las siembras iniciales se encontraron dos cepas de hongos cuya actividad celulolítica era mayor que algunas de las cepas bacterianas aisladas y por ello se determinó trabajar con ellos, por lo que algunas técnicas se tuvieron que modificar.

A partir de las muestras seleccionadas con mayor actividad celulolítica se realizó una confirmación en el laboratorio 8 de posgrado de la FES Cuautitlán, reproduciendo la técnica en placas individuales para cada cepa y sembrando por triplicado cada semana durante 5 semanas, las cepas se sembraron en agar CMC y tras 72 horas de crecimiento (bacterias) y 192 horas (hongos) se procedió a revelar las placas con colorante Rojo Congo, para corroborar que las cepas tuvieran actividad celulolítica como se observa a continuación.

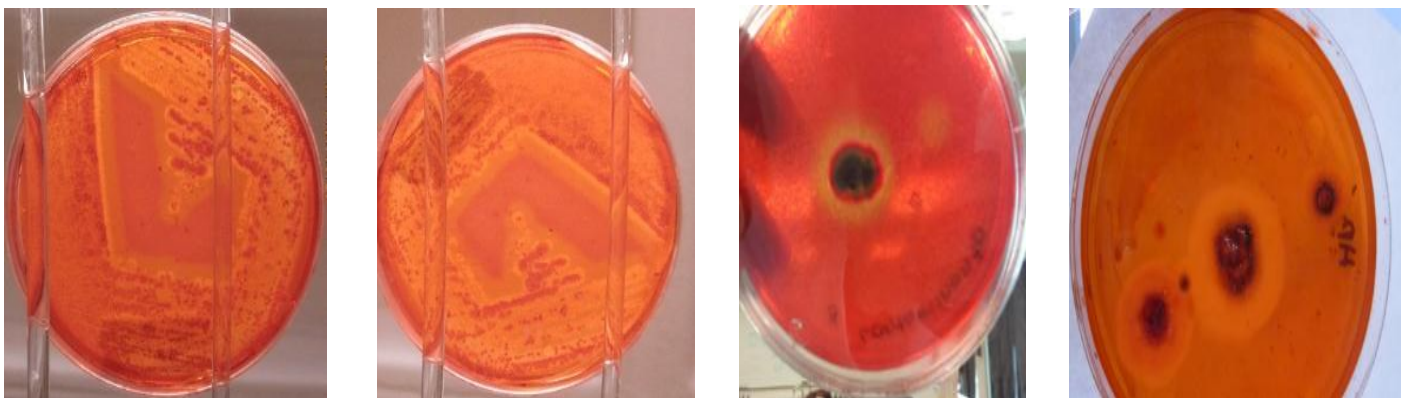


Figura 7 Crecimiento de cepas con actividad celulolítica en agar CMC revelado con rojo Congo, las zonas de hidrólisis de observan más claras a contra luz, después del enjuague. **A.** Cepa 1 bacteriana, **B.** Cepa 2 bacteriana, **C.** Hongo fuliginoso, **D.** Hongo hialino

Tras la verificación de la actividad celulolítica con colorante rojo Congo se procedió a realizar la identificación bioquímica de las cepas bacterianas, para lo cual se les realizaron pruebas bioquímicas primarias para identificar los géneros bacterianos, una vez identificados los géneros bacterianos se procedió a realizar pruebas bioquímicas secundarias para la identificación de las especies de las dos cepas bacterianas, los resultados obtenidos, **Tabla 1, 2, 3 y 4.**

Tabla 2 Pruebas bioquímicas primarias de identificación de Bacterias con actividad celulolítica.

Prueba	Cepa 1	Cepa 2
Gram	Bacilos gramnegativos en pares y sin agrupación	Bacilos gramnegativos en pares y cadenas cortas
OF	F	O
Motilidad	+	+
Catalasa	-	+
Oxidasa	+	+

Tabla 3 Pruebas bioquímicas secundarias de identificación de Bacterias con actividad celulolítica.

Prueba	Cepa1	Cepa2
Reducción de nitratos	+	+
Citrato de Simmons	-	+
Ureasa	-	-
Producción de Gelatinasa	-	-
Descarboxilación de Ornitina	-	+
Malonato	-	-
Resistencia a NaCl 6.5%	-	+
Producción de SH ₂	-	-
Hidrólisis de Arginina	+	-
Fenilalanina	-	-
Descarboxilación de Lisina	+	-
Crecimiento en agar MacConkey	-	+
Fluorescencia en luz UV	-	+

Tabla 4 Prueba de sensibilidad a los antibióticos para la Cepa 1 para la confirmación de su identidad. (Cepa probable: *Cellvibrio japonicus*.)

Sensibilidad a Antibiótico	Cepa 1
Novobiocina 5µg	+
Estreptomina 10µg	+
Tetraciclina 10 µg	+
Ampicilina 10µg	-
Sulfametoxazol 5µg	-
Cefalonia 25µg	+

Tabla 5 Hidrólisis de Carbohidratos para la identificación de Bacterias con actividad celulolítica

Carbohidrato	<i>C. japonicus</i>	<i>P. fluorescens</i>
Glucosa	+	+
Arabinosa	-	+
Dulcitol	+	-
Fructosa	+	-
Inositol	-	-
Lactosa	+	-
Manosa	+	+
Manitol	+	-
Ramnosa	-	-
Salicin	-	-
Sacarosa	-	+
Sorbitol	-	-
Xilosa	-	+

En el caso de los hongos se sembraron en diferentes medios sólidos (Urea, Borelli y DTM) para observar su comportamiento y crecimiento en dichos medios **Figura 7**, y se les realizaron micro cultivos por triplicado a cada una de las cepas, para hacer la observación microscópica con el colorante azul de algodón lactofenol, como se observa en la **Figura 8** y un auxograma para cada una de las cepas fúngicas **Tabla 5**.



Figura 8 Medios DTM, Borelli y Urea, crecimiento tras 192 horas de crecimiento de cada una de las cepas. **A.** Hongo hialino anverso y reverso **B.** Hongo fuliginoso anverso y reverso.

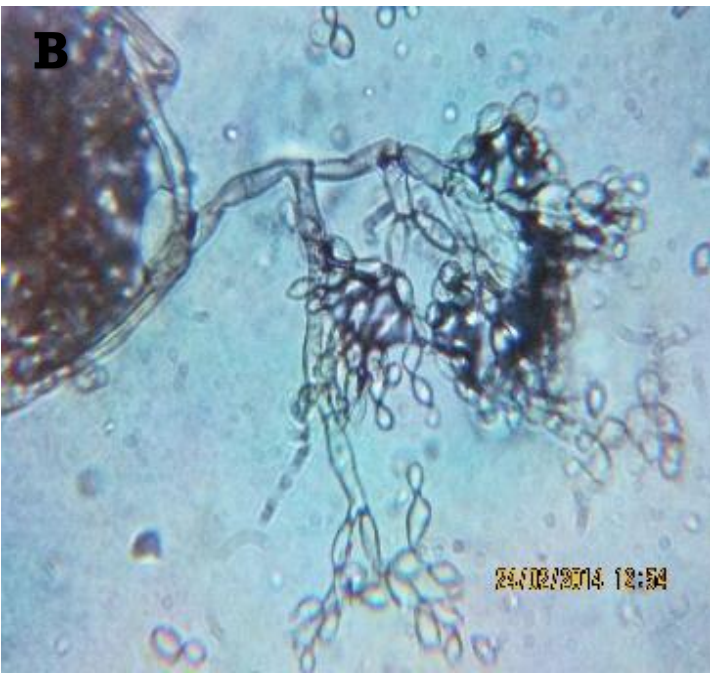
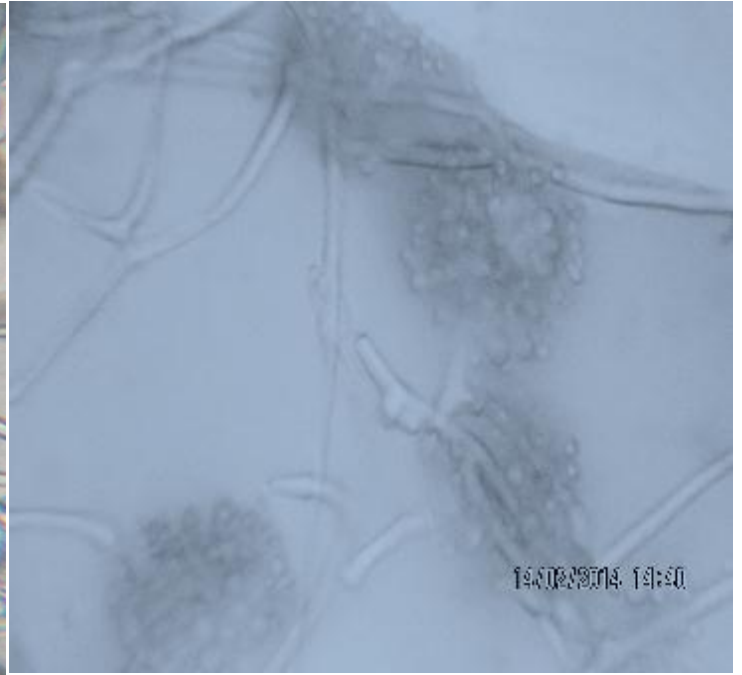
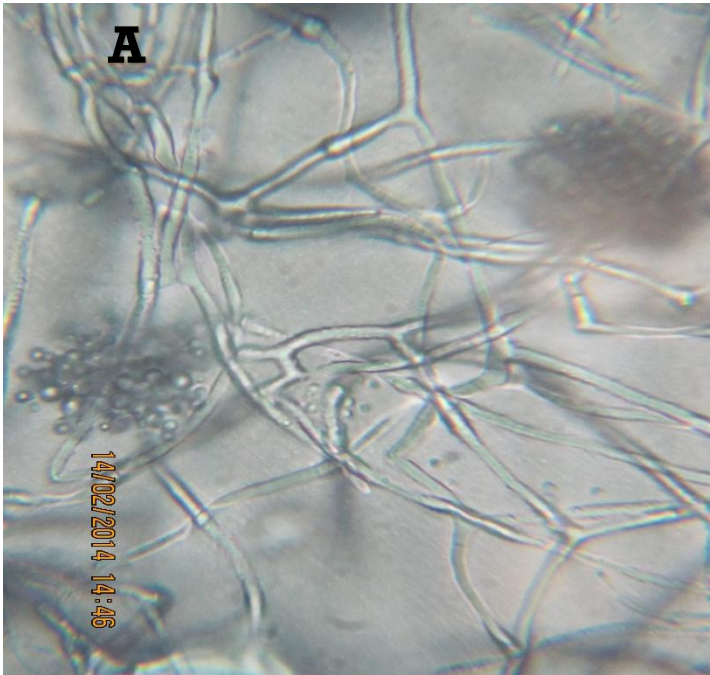


Figura 9 Microfotografías de las estructuras fungicas, a partir de los microcultivos tición con azul de lactofenol de los hongos hialino (A) y fuliginoso (B), 40x.

Tabla 6 Hidrólisis de Carbohidratos para la identificación de Hongos con actividad Celulolítica

Carbohidrato	<i>B. bassiana</i>	<i>F. compacta</i>
Glucosa	-	+
Arabinosa	-	-
Dulcitol	+	+
Fructosa	+	+
Galactosa	-	+
Inositol	-	-
Lactosa	+	+
Manosa	-	+
Manitol	-	-
Ramnosa	-	+
Salicin	+	+
Sacarosa	+	-
Sorbitol	-	-
Xilosa	+	+

Realizadas dichas pruebas se lograron identificar los géneros y especies bacterianos, identificándose los géneros, ***Cellvibrio japonicus*** para la Cepa 1 y ***Pseudomonas fluorescens*** para la cepa 2, mientras que para los hongos se identificó el hongo hialino como ***Beauveria bassiana*** y el hongo fuliginoso como ***Fonsecaeeae compacta***.

Para corroborar la capacidad de los microorganismos de utilizar el papel bond como única fuente de carbono se diseñó un medio el cual tuviera como única fuente de carbono la celulosa del papel bond, al que se nombró Agar Papel, y en el cual se sembraron cada una de las cepas bacterias y hongos, si se observaba crecimiento se podría decir que los microorganismos son capaces de hidrolizar y utilizar la glucosa contenida en el papel bond para su crecimiento. Tras 72 horas de la

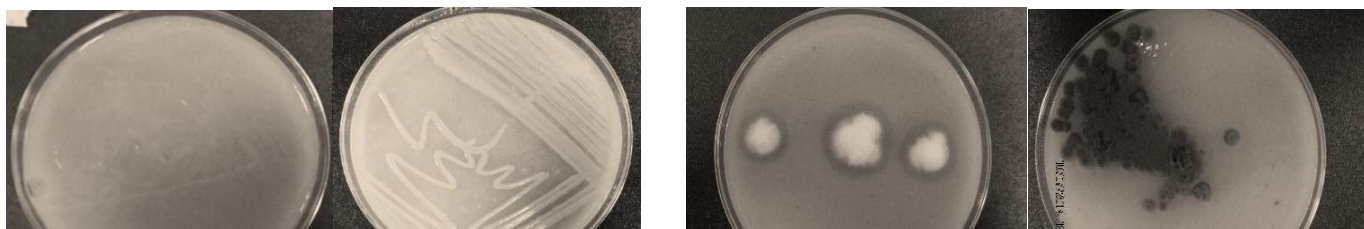
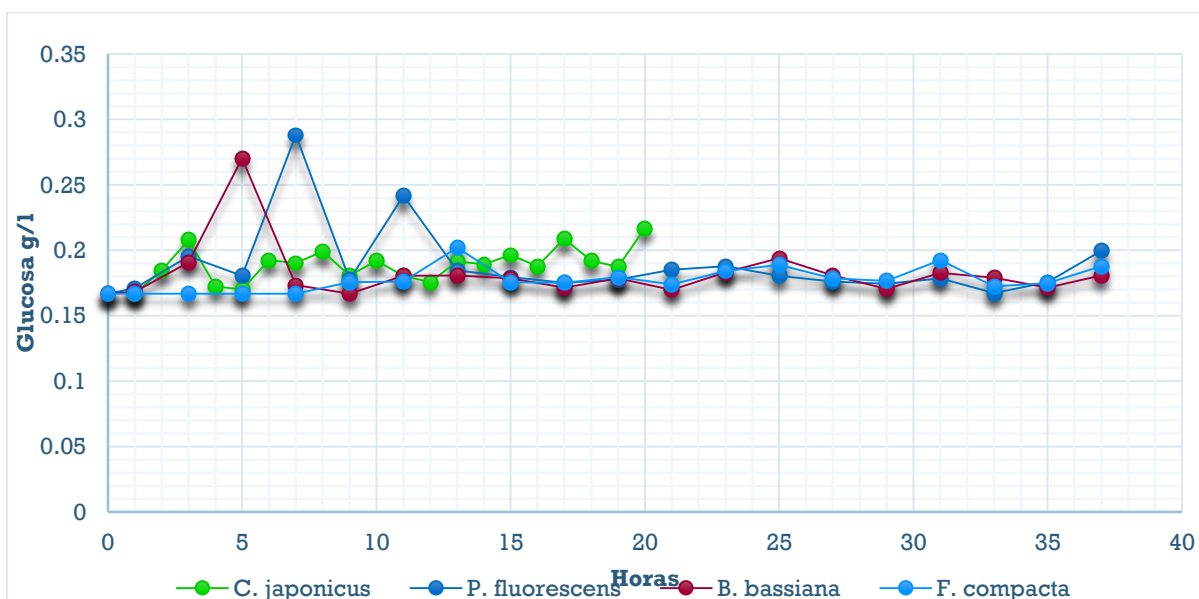


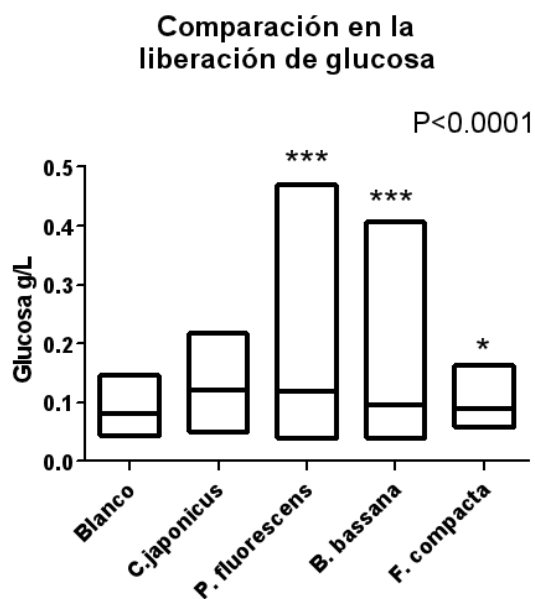
Figura 10 Crecimiento tras 72 horas de incubación en Agar Papel de las cepas bacterianas **A. *Cellvibrio japonicus*** y **B. *Pseudomonas fluorescens*** a 30° C y de los hongos **C. *Beauveria bassiana*** y **D. *Fonsecaeeae compacta*** a temperatura ambiente

inoculación se observaron los crecimientos **Figura 9**.

A la par se realizó la determinación de la liberación de azúcares reductores a partir de papel bond con tinta como única fuente de carbohidratos, dichos resultados se ilustran en la **Gráfica 1**, a partir de los resultados obtenidos se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos para comparar la liberación de azúcares reductores entre los distintos microorganismos **Gráfica 2**.

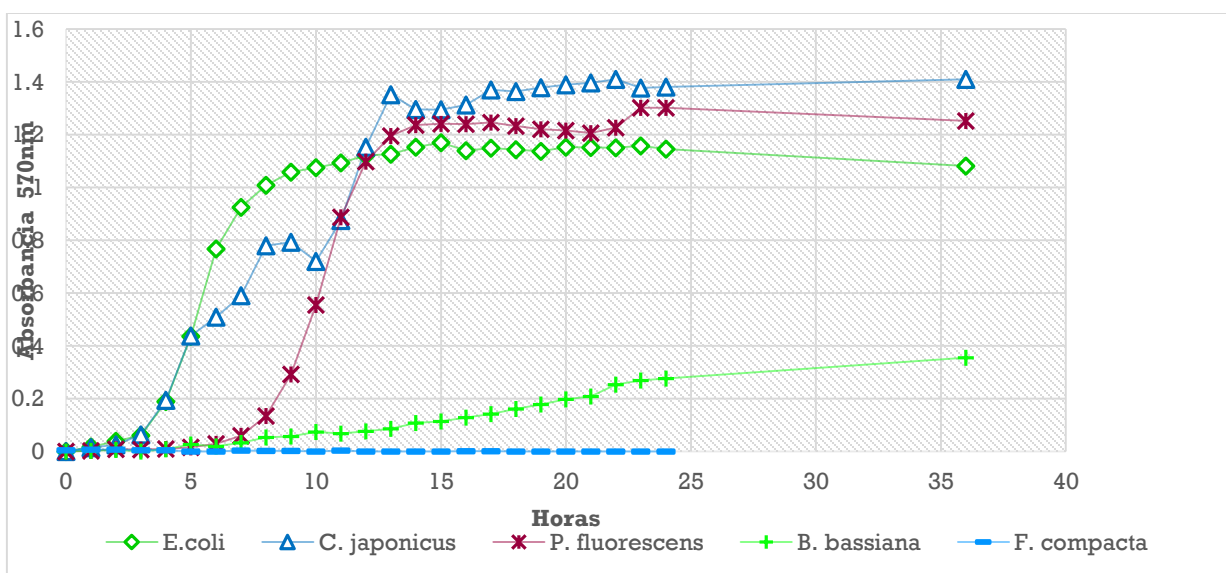


Gráfica 1 Análisis cuantitativo de la liberación de azúcares reductores a partir de la celulosa contenida en el papel bond con tinta, medida cada dos horas durante 36 horas



Gráfica 2 Comparación de la liberación de glucosa a partir de papel bond con tinta para cada microorganismo celulolítico durante 36 horas.

Paralelamente a la cuantificación de los azúcares reductores se realizó una curva de crecimiento para los microorganismos aislados, como se mencionó anteriormente, inicialmente la metodología estaba pensada solo para especies bacterianas por lo que la técnica utilizada no fue propia para los hongos ya que por el tipo de crecimiento que estos presentan, no fue posible medir su crecimiento espectrofotométricamente como se hizo con las cepas bacterianas, de las cuales se muestra el crecimiento en 36 horas en la **Gráfica 3**;



Gráfica 3 Curva de crecimiento respecto al tiempo de los microorganismos con actividad celulolítica utilizando como estándar a E.coli con comportamiento conocido y reportado en la literatura.

Al ver dicho problema en la medición del crecimiento se replanteo una alternativa para medir el crecimiento de los hongos el cual se midió por el tamaño del diámetro de crecimiento cada 24 horas en agar SDA por 192 horas y cuyos resultados se muestran en la **Tabla 7**. Al medir el diámetro de crecimiento se pudo observar que el hongo fuliginoso *Fosecaeeae compacta* empieza creciendo de manera radial y aproximadamente a las 72 horas presenta pequeños crecimientos circulares a los alrededores del crecimiento inicial dichos crecimientos aumentan en número conforme pasa el tiempo, mientras que el hongo *Beauveria bassiana* mantiene su crecimiento radial hasta ocupar el 100% del diámetro de la caja más allá de las 192 horas.

Tabla 7 Diametro de crecimiento cada 24 horas para los hongos *Beauveria bassiana* y *Fonsecae compacta* en medio SDA. Crecimiento medido hasta las 192 horas.

Horas transcurrida:	Creimiento en mm de <i>B. bassiana</i>	Crecimiento de mm de <i>F. compacta</i>
0	0	0
24	10	50
48	40	90
72	80	140
96	120	200
120	180	230
144	210	250
168	250	270
192	300	290

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.

Se realizó una búsqueda en la base de datos de GenBank de la plataforma NCBI, donde se obtuvieron los códigos de acceso de los genes codificantes para las hidrolasas pertenecientes a cada uno de los microorganismos con capacidad celulolítica, excepto para *Fonsecae compacta* para la cual actualmente no existen datos. Los genes obtenidos fueron cel3C y man26C para *Cellvibrio japonicus*, SBW25 para *Pseudomonas fluorescens* y BBA_01743 para *Beauveria bassiana*.

La **Tabla 8** resume las características de los genes, que detallan las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos, así como la función de cada una de las enzimas.

Tabla 8 Análisis bioinformático de los genes cel3c, man26B, PFLU_RS1485 y BBA_01743 de microorganismo celulolíticos en GenBank.

Gen	Tamaño (gen)	Tamaño (proteína)	Localización subcelular	Función	No. de Acceso (gen)	No. de acceso (proteína)
cel3C	2547bp	869aa	Citoplasma y excretada al exterior	Hidrólisis de enlaces 1,4- β -glucosídicos	NC_010995	YP_001980747
man26A	1647bp	486aa	Membrana de diferentes orgánulos	Hidrólisis de enlaces β -glucosídicos de cadenas lineales	AY187034	AAO31762
PFLU_RS0148	1197bp	398aa	Secretadas a través de la membrana	Hidrólisis de enlaces D-glucosídicos	NC_012660	CAY46580.1
BBA_05617	1701bp	434 aa	Membrana, excretada al exterior	Hidrólisis de los enlaces β -glucosídicos	NW_007930850	EJP65286

Tabla 9 Secuencias homologas de los genes cel3c, man26B, PFLU_RS01485 de bacterias celulolíticas entre Bacillus subtilis, gen BAB04322, perteneciente a la celulasa de dicho microorganismo.

Microorganismo problema		Características de la bacteria Bacillus subtilis			Resultados de la evaluación en BLAST	
Gen	Microorganismo	bp	Tamaño de Proteína (aa)	Acceso NCBI	e value	% de Identidad
cel3C	<i>C. japonicus exo-glucanasa</i>	732	574	NC_016047	0.0	78
man26A	<i>C. japonicus endo-glucanasa</i>	732	574	NC_016047	0.011	93
PFLU_RS0148	<i>P. fluorescens</i>	732	574	NC_016047	0.0 – 0.8	76

Tabla 10 Secuencia del gen BBA_05617 de Beauveria bassiana, comparada con la secuencia perteneciente a la celulasa del gen ETS00735 perteneciente al hongo Trichoderma reesei, perteneciente a la celulasa de dicho hongo.

Finalmente con los datos obtenidos y las secuencias de aminoácidos obtenidas en

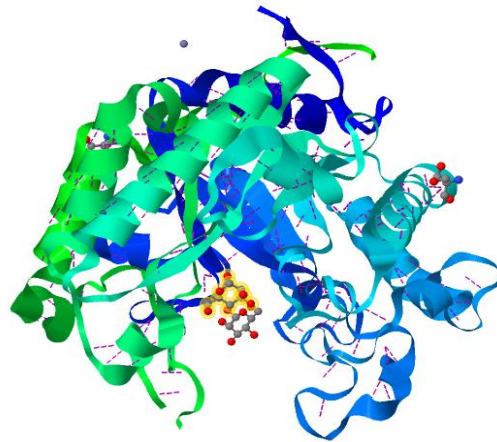
Microorganismo problema		Características de Trichoderma sp.			Resultados de la evaluación en BLAST	
Gen		bp	Tamaño de Proteína (aa)	Acceso NCBI	e value	% de identidad
BBA_05617	B. bassiana β -glucanasa	1456	419	AY466436	0.0	76

las bases de datos, **Tabla 10**, las cuales son propias de los microorganismos analizados e identificados y para los cuales se planea realizar un análisis molecular, así como la extracción, purificación y tipificación de las enzimas, se realizaron los modelos tridimensionales correspondientes a la enzimas de los microorganismo analizados a partir de las secuencias antes mencionadas y se realizó un resumen que incluye la figura tridimensional de las enzimas implicadas y sus principales características. Donde el sitio de unión al ligando se observa como una estructura globular de color rojo.

Se buscaron datos en diversos artículos sobre el hongo Fonsecaea compacta, pero a la fecha no existe el análisis genético para dicho organismo, ya que el análisis de los genes de los hongos negros se inició el 14 de Julio de 2014.

endo-1,4-b-manosidasa

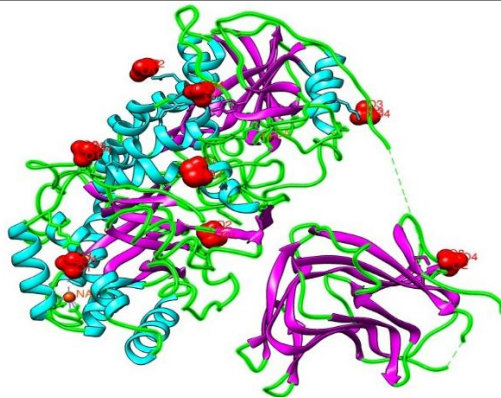
Cellvibrio japonicus



Clasificación	Hidrolasa
E.C	3.2.1.78
Cadenas	A
Longitud	486 aa
Estructura secundaria	

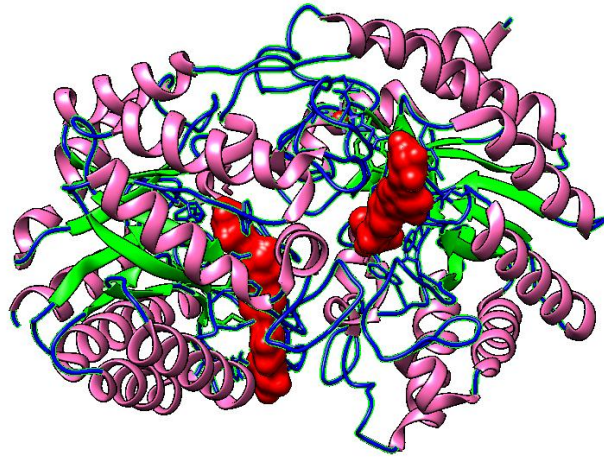
Exo glucan-1,4-b-glucosidasa

Cellvibrio japonicus



Clasificación	Hidrolasa
E.C	3.2.1.3
Cadenas	A, B, C, D
Longitud	869 aa
Estructura secundaria	

endo-1,4-D-glucanasa
Pseudomonas fluorescens



Clasificación Glicohidrolasa

E.C 3.2.1.6

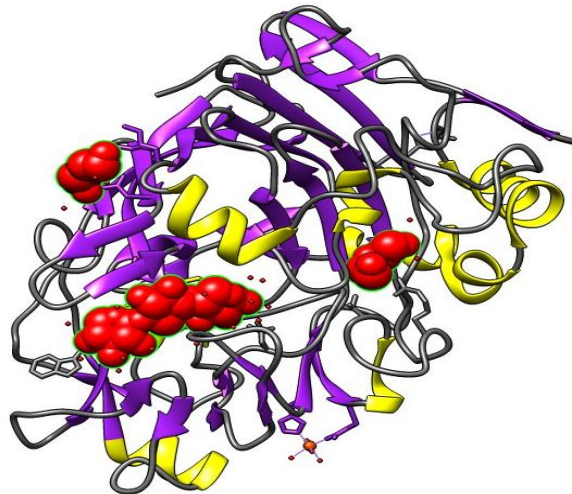
Cadenas A, B

Longitud 398 aa

Estructura secundaria



1,4-b-celobisidasa
Beauveria bassiana



Clasificación Hidrolasa

E.C 3.2.1.91

Cadenas A

Longitud 434 aa

Estructura secundaria



J) DISCUSIÓN

Debido a la vida moderna y el consumismo que crece y por diversos factores la generación de basura y desechos sólidos ha incrementado exponencialmente en las últimas décadas, con ellas ha aumentado también la preocupación por reutilizar materiales que antes eran considerados como desechos, entre los más aprovechados están, el vidrio, metales diversos, desechos orgánicos, el papel y productos derivados del mismo.

Como se mencionó, la obtención de las muestras fue realizada fuera de la facultad por alumnos del CBT “Dr. Efraín Hernández Xolocotzi”. Partiendo de las cepas obtenidas del primo aislamiento y de las cuales sólo se seleccionaron cuatro muestras finales, en base a la capacidad de hidrolizar la celulosa, para dicha selección, se llevaron a cabo pruebas cualitativas de la hidrólisis de celulosa en medio CMC reveladas con rojo Congo, en las que fuese posible observar a simple vista los halos producidos; las cuatro muestras finales se seleccionaron en base a el diámetro y extensión del halo, según fuera el caso. **(Anexo 1)**

Identificación bioquímica de los microorganismos de interés con actividad celulolítica confirmada mediante pruebas cualitativas con rojo Congo

Al realizar las observaciones iniciales de las tinciones de Gram se observa que ambas muestras bacterianas son bacilos cortos Gramnegativos sin agrupación, por lo que inicialmente se pensó que se trataba de la misma bacteria, sin embargo al realizar las pruebas bioquímicas se demostró que no se trataba del mismo microorganismo, sobre todo al realizar las pruebas de asimilación de carbohidratos, ya que su sistema metabólico y por consecuencia su material genético es diferente al asimilar distintos carbohidratos, demostrando que producen distintos tipos de enzimas que pueden ser o no constitutivas; consultando el manual Bergey's de bacteriología (Holt , 1994) se determinó que de acuerdo a los datos de morfología macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas que la cepa 1 corresponde a la bacteria *Cellvibrio japonicus* y la cepa 2 a la bacteria *Pseudomonas fluorescens*. Mientras que la identificación de los hongos se realizó por el análisis de las características macroscópicas, color del micelio aéreo, características de

crecimientos, etc. y la observación microscópica de las hifas y las estructuras especializadas, con la tinción de azul de algodón y las pruebas de asimilación de carbohidratos, de acuerdo a esto se determinó que el hongo blanco corresponde al hongo ascomiceto *Beauveria bassiana* que es común encontrar de forma natural en los suelos alrededor del mundo y el Hongo Negro corresponde al hongo filamentoso *Fonsecaeeae compacta*.

Estás últimas pruebas arrojaron una peculiaridad para el hongo blanco ya que al observar las pruebas de asimilación de carbohidratos podemos observar que no es positivo para la glucosa, y sin embargo es uno de los más eficientes degradadores de la celulosa, inicialmente se pensó que era un problema con el reactivo, pero la prueba se repitió en suficientes ocasiones como para descartar esa teoría; posteriormente buscando las posibles causas se encontró que esto puede ser causado por la manera en que las enzimas del hongo rompen el enlace de la glucosa, es decir, no procesa directamente la forma cíclica de la glucosa, sino que la enzima realiza los cortes de tal manera que libera dos moléculas de glucosa (celobiosa) una con forma cíclica y otra como un azúcar lineal, se especula que el enantiomero D-glucosa es el que permite el paso al citoplasma celular, y una vez en el interior otras enzimas separan la molécula de celobiosa permitiendo entonces llevar a cabo el proceso de glicolisis, sin embargo, dicho mecanismo no está confirmado y se puede asegurar que esa sea la causa. (Warren, 1996)

Comprobación cualitativa de la actividad celulolítica en agar CMC revelados con rojo Congo.

Las pruebas cualitativas en agar CMC dan un acercamiento a lo que se busca sin realizar técnicas más complejas, que requieran equipos especiales o el uso de químicos, por lo cual es de gran utilidad. La utilidad del medio sólido CMC reside en el hecho que tiene como única fuente de carbono la carboximetil celulosa, por lo tanto aquellos microorganismo que no tengan la capacidad de hidrolizar la celulosa no serán capaces de crecer en dicho medio. (Hendricks , Doyle, & Hugley , 1995) Esta capacidad se mide por el tamaño del halo de hidrólisis después de revelar el medio con rojo Congo, según la técnica de, (Crawford & McCoy, 1972) . Esta técnica

tiene su fundamento en la capacidad del rojo Congo de formar puentes de hidrógeno con los grupos carboxilo (COOH-) en las cadenas de celulosa, cuando las enzimas celulolíticas realizan los cortes en las largas cadenas los grupos carboxilo pierden un átomo de hidrógeno y cambian su valencia y por lo tanto las moléculas de rojo Congo no pueden formar puentes de hidrógeno lo que se traduce en la falta de coloración que observamos como halos, en base a esto los microorganismos que produjeron un mayor halo de hidrólisis fueron las bacterias, ya que este fue de tal magnitud que no fue posible medirse, ya que el crecimiento de las bacterias se dio en todo el estriado realizado durante la inoculación, sin embargo hay que tomar en cuenta que los hongos requieren un mayor tiempo de crecimiento y pese a ello muestran halos de hidrólisis bastante claros. Una vez confirmada cualitativamente la capacidad celulolítica de los microorganismos se procedió a medir la capacidad de liberar glucosa de los mismos.

Liberación de glucosa en los microorganismos con actividad celulolítica confirmada.

Una vez confirmada la capacidad celulolítica de las muestras seleccionadas se procedió a realizar una evaluación cuantitativa, por medio de la técnica espectrofotométrica con ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959), la cual se fundamenta en la reacción del reactivo con el grupo carbonilo o con el carbono anomérico de azúcares reductores, en este caso al tener como fuente de carbono a la celulosa, el producto final de la hidrólisis enzimática de esta es glucosa, por lo tanto los resultados obtenidos corresponden únicamente a la glucosa libre en el medio, esto implica la oxidación de la glucosa y al mismo tiempo el ácido se reduce a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico en condiciones alcalinas y temperaturas aproximada de 100°C, visualizándose una coloración rojiza proporcional a la cantidad de glucosa en el medio. El medio utilizado tenía como única fuente de carbono papel bond con tinta en medio líquido.

Al observar la gráfica a lo largo del tiempo podemos darnos cuenta que en el tiempo cero, es decir al inicio del estudio hay azúcares reductores presentes ya que al realizar la reacción y medirla espectrofotométricamente se obtiene una cantidad

azúcares los cuales se cree son azúcares liberados por la manipulación del papel, ya que este fue molido, pues su solubilidad, debido a la celulosa es baja. Independientemente del origen de estos azúcares se observa que los microorganismos utilizan dichas azucares pues en la siguiente medición se ve un drástico descenso en la cantidad de azúcares libres presentes; posteriormente solo la bacteria *Pseudomonas fluorescens* y el hongo *Beauveria bassiana* registraron un gran incremento en la liberación de glucosa la cual concuerda con la fase de adaptación en la curva de crecimiento, sin embargo fue el único evento registrado con dicha cantidad, esto puede ser a que entre mayor es el crecimiento de los microorganismo el requerimiento de nutrientes es mayor y al no incrementarse la cantidad de papel que es la única fuente de carbono no se puede ver una mayor liberación al llegar a la fase estacionaria de los microorganismos.

Por otra parte, al comparar la liberación de glucosa cuando la fuente de carbono es papel y las pruebas cualitativas se observa que la correlación entre estos es baja, ya que mientras en los medios sólidos con carboximetil celulosa se observan grandes áreas de hidrólisis al ser revelados, sobre todo por las bacterias, al cuantificar la glucosa liberada esta es baja y es utilizada casi en su totalidad por los mismos microorganismos, esto se observa como una desventaja del medio CMC el cual puede ser hidrolizado por enzimas que no son necesariamente celulolíticas, pero que en combinación con algunas de estas son capaces de generar grandes áreas de hidrólisis y que al retarlas a una fuente pura de celulosa (papel bond), su eficiencia en cuanto a la liberación de glucosa es menor, pues las únicas enzimas que realizan la hidrólisis son las estrictamente celulolíticas. (Brown & Levine, 1993).

Es preciso recordar que para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa los microorganismos con capacidad celulolítica forman complejos biológicos (sustrato-enzima o enzima-microorganismo-sustrato) dependiendo del tipo de microorganismos (bacterias aerobias o anaerobias/ hongos), estos serán secundarios o terciarios, los complejos secundarios contienen cuatro bucles de superficie que dan lugar a un túnel con una longitud de 50 \AA ; los complejos terciarios contienen dos bucles de superficie que dan lugar a un túnel de 20 \AA . Las

cadena de celulosa ahora más cortas pasan por estos túneles y sufren otro corte formando celobiosa, que se ha visto es el producto que se produce en mayor cantidad durante la hidrólisis; mientras que la glucosa libre se produce en menores cantidades (Divine, y otros, 1994), basándonos en este hecho, podemos decir que esta puede ser otra razón del porqué las cantidades liberadas de glucosa son bajas al realizar la reacción con DNS, ya que si este sólo reacciona con azúcares reductores no reconocerá las moléculas de celobiosa (compuestas por dos moléculas de glucosa) presentes.

Análisis bioinformático de los genes codificantes de las enzimas con actividad de celulasa de los microorganismo con actividad celulolítica confirmada.

Al realizar el análisis bioinformático se tuvieron varias dificultades, en primer lugar al buscar genes conocidos para enzimas con capacidad celulolítica para el hongo *Fonsecaeeae compacta* no se encontraron registros en ninguna de las bases de datos ya que el consorcio internacional comenzó recién la secuenciación de los hongos negros en el mes de Julio de 2014. Por ello es que no se incluyen datos en el análisis bioinformático para este.

Respecto a los tres microorganismos analizados en este estudio se buscaron en diversos artículos (Blackman, Cullene, & Hardham, 2014) (Takasuka, Book, Lewin, Currie, & Fox, 2013) (Xiao G, 2012) si existían enzimas conocidas y secuenciadas con la capacidad de hidrolizar celulosa, una vez confirmada la existencia de dicha información se procedió a buscar en las las bases de datos genómicas (NCBI) los genes que traducían para estas enzimas, encontrándose un gen y una enzima para el hongo hialino, *Beauveria bassiana*; por otra parte para las bacterias se encontro un gen perteneciente a la enzima con capacidad celulolítica de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, y dos genes correspondientes a las dos enzimas propias de la bacteria *Cellvibrio japonicus*.

Inicialmente se hizo un resumen con las características de los genes y enzimas de cada uno de los microorganismo, los datos fueron obtenidos de las bases de datos de NCBI y de UNITPRO, en las cuales se encontraron similitudes pese a tener

números de accesos diferentes, recordemos que pese a que las bases de datos americana y europea son de acceso internacional y están relacionadas, pueden encontrarse variaciones, sin embargo, las características halladas fueron las mismas y por lo tanto sólo se tomaron los datos encontrados en las bases de NCBI.

Se analizaron las secuencias proteicas encontradas con las secuencia de una enzima comercial perteneciente a la bacteria *Bacillus subtilis*, utilizada actualmente para procesos de hidrolisis de composta vegetal, utilizada para la producción de etanol; y otra enzima también comercial y utilizada actualmente en procesos industriales de compostaje perteneciente al hongo *Trichoderma reesei*, esto se realizó con el fin de observar si en la enzimas con capacidad celulolítica existe homología y si dicha homología juega un papel importante en la capacidad de hidrolizar celulosa.*

Al analizar los resultados arrojados tras el análisis en BLAST encontramos que existe un grado aceptable de homología, recordemos que para decir que dos secuencias proteicas son homologas debe existir por lo menos un 25% de identidad entre sus aminoácidos, en este análisis encontramos que al realizar el análisis los porcentajes de homología superan el 50%.; recordemos que el porcentaje de homología no garantiza, valga la redundancia que dos secuencias sean homologas, por ello es importante tener en cuenta que existen otros parámetros que se deben de tomar en cuenta.

Al analizar el *e value* o valor esperado observamos que estos son de cero o muy cercanos a cero, este parámetro otorga un valor estadístico al análisis y nos dice si la homología de las secuencias es debida a la casualidad o a una verdadera homología, para garantizar que la homología entre dos secuencias es verdadera, es importante que los valores de *e value* sean los más pequeños posibles, siendo aceptables valores hasta 5 o 6 e para garantizar una verdadera homología, para este estudio los valores fueron muy bajos por lo que se puede afirmar que existe una homología verdadera entre las secuencias analizadas. La importancia del análisis de la homología reside en que las enzimas utilizadas actualmente a nivel industrial en el tratamiento de residuos vegetales para compostaje son las pertenecientes a la

bacteria *Bacillus subtilis* y los hongos del genero *Trichoderma sp.*, las cuales tienen la capacidad de hidrolizar la celulosa de las paredes vegetales de los desechos vegetales, sin que sean inhibidas por la presencia de celobiosa o glucosa libre, dicha característica es importante ya que la hidrólisis del papel genera solo dichos productos; en estudios similares se ha comprobado que muchos géneros de hongos y especies generan halos de hidrólisis en el medio Carboximetil celulosa, sin embargo al enfrentarlos a residuos vegetales que contienen celulosa en su pared celular, las enzimas de estos microorganismos son inhibidas por la celobiosa y glucosa libre. (Hahn-Hägerdal & Palmqvist, 2000) Sin embargo al tener homologías no aleatorias altas podemos suponer que la resistencia a la inhibición de las enzimas está relacionada con las similitudes en las secuencias de aminoácidos.

Por otra parte se realizó el modelado tridimensional en el programa Chimera 8.1 para visualizar los sitios de unión a los ligandos, recordemos que para la utilización de este programa es necesario el uso de archivos con terminación .pdb, los cuales se obtienen de la base de datos Protein Data Bank, dicha base de datos contiene la información de diferentes fuentes y es el deposito a nivel Internacional de los nuevos descubrimientos en proteínas de diferentes microorganismos, lo que la convierte en una base de datos confiable y completa, pues está disponibles no solo las características básicas, si no información adicional de publicaciones, números de acceso en otras bases de datos, entre otros.

K) CONCLUSIONES

- Se aislaron satisfactoriamente microorganismos con capacidad celulolítica, la cual se comprobó cualitativamente mediante la observación de halos de hidrólisis alrededor de las colonias con la prueba con rojo Congo en medio carboximetil celulosa 1%.
- Se comprobó la capacidad de hidrolizar la celulosa para obtener glucosa de los microorganismos aislados y se cuantificó la cantidad de glucosa liberada, siendo el más eficiente *P. fluorescens*, sin embargo con los datos obtenidos es posible afirmar que no es viable recuperar la glucosa para realizar procesos de fermentación mediante la metodología utilizada, por lo que se deben analizar formas alternativas del proceso y una vez establecidas las condiciones adecuadas replicar el modelo.
- Se obtuvieron las gráficas de crecimiento para cada uno de los microorganismos donde es posible observar las etapas de adaptación, crecimiento y mantenimiento y relacionar éstas con la liberación de azúcares reductores a partir de la celulosa contenida en el papel bond con tinta.
- El análisis bioinformático permitió establecer un modelo de simulación de las condiciones necesarias para llevar a cabo el análisis molecular in vitro a realizarse próximamente.
- Las secuencias de aminoácido obtenidas se utilizaron para obtener modelos tridimensionales de las posibles enzimas implicadas y se compararon con los modelos tridimensionales existentes en las bases en línea de Structure de NCBI.

L) PERSPECTIVAS

- Amplificar las regiones 16S ribosomales de las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Cellvibrio japonicus* y 23S del hongo *Beauveria bassiana* y realizar su posterior secuenciación para corroborar la identidad de éstas mediante un método molecular.
- Diseñar y sintetizar los primers adecuados para la amplificación de la fracción 23S ribosomal del hongo *Fonsecaea compacta* para realizar su identificación molecular y contribuir con el consorcio internacional en la secuenciación del genoma de los hongos negros iniciado en Julio de 2014.
- Encontrar las condiciones adecuadas para la recuperación de la glucosa, producto de la hidrólisis de la celulosa contenida en el papel bond con tinta y retar la nueva metodología a volúmenes mayores de papel.

M) REFERENCIAS

- Alexander, M. (1980). *Introducción a la microbiología del suelo*. México: AGT Editor.
- Amartey, S. A., Leak, D. J., & Hartley, B. S. (1991). Effects of temperature and medium composition on the ethanol tolerance of *Bacillus stearothermophilus* LLD-15. *Biotechnology Letters*, 13:627-632.
- B., H. (1990). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280:309-316.
- Barker, R. G. (1969). *U.S.A Patente nº 3.470, 061*.
- Bayer, E. A., Kening, R., & Lamed, R. (1983). Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. *Journal of Bacteriology*, 156: 818 - 827.
- Bayer, E. A., Kening., R., & Lamed, R. J. (1994). The cellulosome—a treasure-trove for biotechnology. *Trends in biotechnology*, 12:378-386.
- Bayern, E. A. (1998). Cellulosomes: structure and ultrastructure. *Journal in Strutural Biology*, 124: 221-234.
- Béguin, P. L. (1996). The cellulosome: an exocellular, multiprotein complex specialized in cellulose degradation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 201-236.
- Benoit, L., Cailliez, A., Géhim , C., Thirion, J., Raval, G., & Petittdemange, H. (1995). Carboxymethylcellulase and avicelase activities from a cellulolytic *Clostridium* strain A11. *Current Microbiology*, 30: 305-312.
- Beyer , H., & Wolfgang, W. (1987). *Manual de Química Orgánica* (Decimonovena ed.). Barcelona, España: Reverté.
- Blackman, L. M., Cullene, D. P., & Hardham, A. R. (2014). Bioinformatic characterisation of genes encoding cell wall degrading enzymes in the *Phytophthora parasitica* genome. *BMC Genomics*, 15: 785-810.

- Brown, M. A., & Levine, M. D. (1993). *Assessment of costs and benefits of flexible and alternative fuel use in the U.S. transportation sector Costs of methanol production from biomass*. Washington D.C.: U.S. Department of Energy .
- Brown, R. M. (2000). Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38, 57-67.
- Castillo-Rodríguez, F. (2005). *Biotecnología ambiental*. Madrid: Tébar, S.L.
- Crawford, D. L., & McCoy, E. (1972). Cellulase of *Thermomonospora fusca* and *Streptomyces thermodiastaticus*. *Applied Microbiology*, 24: 150-152.
- Ding, S.-Y. R. (2001). Cellulosomal scaffoldin-like proteins from *Ruminococcus flavefaciens*. *Journal Bacteriology*, 183: 1945-1953.
- Divine, C., Ståhlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Petterson, G., Knowles, J. C., . . . Jones, T. A. (1994). The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesi*. *Science* , 265: 524-528.
- Ege, S. (2004). *Química Orgánica* (Vol. II). Barcelona: Reverté.
- Fan, L. T., Yong-Hyun, L., & Beardmore, D. H. (1980). Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 22: 177-199.
- Félix, C. R., & Ljungdahl, L. G. (1993). The cellulosome: the exocellular organelle of *Clostridium* sp. *Annual Review of microbiology*, 47: 791-819.
- Focher, B., Marzetti, A., Cattaneo, M., Beltrame, P. L., & Carniti, P. (1981). Effects of structural features of cotton cellulose on enzymatic hydrolysis. *Journal of Applied Polymer Science*, 26: 1989-1999.
- Forero, M. (1986). Industrialización de la Glucosa en Colombia. *Tesis de Posgrado*. Bogotá: Universidad Javeriana .

- Gama, F. M., Teixeira, J. A., & Mota, M. (1994). Cellulose morphology and enzymatic reactivity: a modified solute exclusion technique. *Biotechnology and Bioengineering*, 43: 381-387.
- Gamma , F. M., Teixeira , J. A., & Mota, M. (1994). Cellulose morphology and enxymatic reactivity: a modified solute exclusion technique . *Biotechnology and Bioengienery*, 43: 381-387.
- Genaro, A. R. (2003). *Remington Farmacia* (Vigesima ed., Vol. II). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Hahn-Hägerdal, B., & Palmqvist, E. (2000). Fermentation of lignocelululosic hydrolysates II: Inhibitors and mechanism of inhibition. *Biosource Technology*, 74: 25-33.
- Hendricks , C., Doyle, J., & Hugley , B. (1995). A New Solid Medium for Enumerating Cellulose-Utilizing Bacteria in Soil. *Applied Enviromental Microbiology*, 33: 213-218.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280: 309-316.
- Henrissat, B., & Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolase. *Biochemical Journal*, 316: 695-696.
- Henrissat, B., Vigny, B., Buleon, A., & Perez, S. (1988). A scheme for desingnating enzymes that hydolyse the polysaccharides in the cell walls of platns. *FEBS Letter*, 425: 352 - 354.
- Henrissat, B. (1990). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Journal of Biochemistry*, 280: 309-316.
- Hoeniger, J. M. (1985). Microbial descomposition of cellulose in acidfying lakes of south-central Ontario. *Applied and Environmental Microbiology*, 50: 315-322.

- Holt, J. G. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Lippincot Williams & Wilkins.
- Jhonson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2008). NCBI: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36: W5-W9.
- Kauri, T., & Kushner, J. D. (1985). Role of contact in bacterial degradation of cellulose. *FEMS Microbiology*, 31: 301-306.
- Kudo, H., Cheng, K.-J., & Costerton, J. W. (1987). Electron microscopic study of the methylcellulose-mediated detachment of cellulolytic rumen bacteria from cellulose fibers. *Canadian Journal Microbiology*, 33:267-271.
- Lossada, A. A., Formento, J. C., Adell, A. M., & Mina, L. R. (1982). Preevaporado a Presión en Digestión Batch Alcalina. *Revista Atipca*, 56-65.
- Lu, W., Wang, H., Yang, S., & Nie, Z. (2005). Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 51: 353-360.
- Lynd, L. R., Elander, T. R., & Wyman, C. E. (1996). Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57-58: 741 - 761.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology REVIEWS*, 506-577.
- Lynd, L. R., Wyman, C. E., & Gerngross, T. U. (1999). Biocommodity engineering. *Biotechnology Progress Journal*, 15: 777 - 793.
- Malherbe, J. S., & Cloete, T. E. (2002). Lignocellulose Biodegradation: Fundamentals and applications. *Environmental Science & Bio/Technology*, 1 : 105-114.

- Mansfield, S., & Mooney, C. y. (1999). Substrate and Enzyme Characteristics that Limited Cellulose Hydrolysis. *Biotechnology*, 31: 426-428.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Miron, J., Ghedalia-Ben, D., & Morrison, M. (2001). Adhesion mechanism of rumen cellulolytic bacteria. *Journal Dairy Science*, 84: 1294-1309.
- NCBI. (29 de Julio de 2014). *BLAST*. Recuperado el 05 de Septiembre de 2014, de <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- NOM-161-SEMARNAT-2011. (01 de febrero de 2013). México, México: Diario Oficial de la Federación.
- Ohmiya, K., Sakka, K., Kimura, T., & Karita, S. (1997). Structure of cellulases and their applications. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 14: 365-414.
- Olsen, G. C., Woese, C. R., & Overbeek, R. (1994). The wind of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *Journal Bacteriology*, 176: 1-6.
- Poulsen, O. M., & Petersen, L. W. (1988). Growth of *Cellulomonas* sp. ATCC 21399 on different polysaccharides as sole carbon source induction of extracellular enzymes. *Appl. Microbiology and Biotechnology*, 29: 480-484.
- Salgado- Cornejo, E. A. (23 de Mayo de 2010). *Química UBB*. Recuperado el 27 de Abril de 2014, de http://quimicaubbaexs.blogspot.mx/2010_05_01_archive.html
- Sanchez - Leal, L. C., & al., e. (2005). Evaluación de la congelación para la *NOVA*, 3 (4): 21 - 28.
- Sánchez, S., & Farrés, A. (1987). Regulación de enzimas microbianas. En A. López, & Q. R., *Tecnología enzimática* (págs. 37 - 46). México D.F: UNAM.

- Sandoval-Z., E. (2005). *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*. México DF: UNAM.
- SCA. (2010). *Fabricación Industrial de papel*. México DF: Tryckeribolage .
- St Jhon, F. J., González, J. M., & Pozharski, E. (2010). Consolidation of glycosyl hydrolase family 30: a dual domain 4/7 hydrolase family consisting of two structurally distinct groups. *FEBS Lett.*, 5;584(21): 4435 - 4441.
- Stone, A. J. (1968). A structural model for the cell wall of of water-swollen wood pulp fibres based on their accesibility to macromolecules. *Cellulose Chemistry*, 3, 3: 343-358.
- Strobel, H. J., Caldwell, F. C., & Dawson, K. A. (1995). Carbohydrate transport by the anaerobic thermophilic *Clostridium thermocellum* LQRI. *Applications in Enviromental Microbiology*, 61: 4012-4015.
- Takashima, S., Nakamura, M., & Hidaka, H. (1999). Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. *Japanese Biochemistry*, 125: 728-736.
- Takasuka, T. E., Book, A. J., Lewin, G. R., Currie, C. R., & Fox, B. G. (2013). Aerobic deconstruction of cellulosic biomass by an insect-associated *Streptomyces*. *Scientific Report*, 3: 1030-1038.
- Teather , R., & Wood, P. (1982). Use of con red - polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied Enviromental Microbiology*, 43: 777-780.
- Tengerdy, R. P., Rho, W. H., & Mohagheghi, A. (1991). Liquid fluidized bed starter culture of *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Appl. Biochemistry*, 27: 195-204.
- Teufel, A., Krupp, M., Weinmann, A., & Galle, P. R. (2006). Current bioinformatics tools in genomic biomedical research. (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 17: 967- 973.

- Thether, R., & Wood, P. (1982). Use of congo red - polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ. Microbiology*, 43: 777-780.
- Uozomi, N. A., Hayashi, T., Ito, A., & all, e. (1993). Secretion of thermophilic bacterial cellobiohydrolase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 9: 714 - 720.
- Velez-Gonzalez, M. F. (02 de Abril de 2014). Tesis de Licenciatura. *Presencia de los principales genes relacionados en la vía de regulación del estrés oxidativo en Candida glabrata mediante análisis bioinformático*. México: UNAM.
- Wachinger, G., Bronnenmeier, K. L., Staudenbauer, W., & Schrempf, H. (1989). Identification of mycelium - associated cellulase from *Streptomyces reticuli*. *Applied Environment Microbiology*, 55: 125 - 129.
- Wang, D. Z., Zu, Y., & Gao, P. (1996). Studies of the regulation of cellulase system by ATP and cAMP in mycelial fungi. *Weishengwu Xuebao*, 36: 12 - 18.
- Warren, R. A. (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annual Review of Microbiology*, 50: 183 - 212.
- Watnabe, H., & Tokuda, G. (2001). Animal cellulases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 1167-1178.
- Weimmer, P. J., Hackney, J. M., & French, A. D. (2000). Fermentation of bacterial cellulose / xylan composite by mixed ruminal microflora: implications for the role of polysaccharide matrix interactions in plant cell wall biodegradability . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1727 - 1733.
- Woese, C. R. (2000). Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 8392-8396.

- Xiao G, Y. S. (2012). Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific Report*, 2: 483- 493. Obtenido de PMC.
- Yernool, D. A., McCarthy, J. K., Eveleigh, D. E., & Bok, J. D. (2000). Cloning and characterization of the glucooligosaccharide catabolic pathway b-glucan glucohydrolase and cellobiose phosphorylase in the marine hypertermophile *Thermotoga neapolitana*. *Journal Bacteriology*, 182: 5172-5179.
- Zhang, H. Y. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screenin and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 452 - 481.

ANEXOS

ANEXO 1

Se delimitaron unidades de muestreo divididas en bloques de 4 x 4 m² (dependiendo de las características del terreno haciendo bloques en columnas o bloques adyacentes de manera lineal), recolectándose una muestra a 5 cm de profundidad contando desde la superficie del suelo de 100 g cada una en el centro de cada bloque, en la tabla 1 se describen las especificaciones de muestreo. Todas las muestras se guardaron en envases plásticos a 4°C hasta su procesamiento.

Tabla 1. Especificaciones de muestreo. *Se tomó 1 g por cada muestra, el motivo por el cual se optó por hacer cultivo se explica en la discusión de resultados.

LOCALIDAD	CARACTERÍSTICAS DE MUESTRA	CLAVE	Número de muestras
Hueypoxtla, Colonia Centro (limites)	Suelo y materia vegetal (hojarasca corteza de árboles)	HC	6
Santa María Ajoloapan, Los Álamos	Suelo y materia vegetal (restos de nopales y hojarasca) en descomposición con alto contenido de humedad	SA	6
Tianguistongo, El Mogote	Suelo y materia vegetal (hojarasca corteza de árboles)	TM	6
Tianguistongo, Los Ahuhuetes	Suelo y materia vegetal (corteza de árboles principalmente) en descomposición con alto contenido de humedad	TA	6
Laboratorio CBT Hueypoxtla*	Raspado de superficies de madera húmeda	L	5

Aislamiento primario: Se realizaron diluciones sucesivas de 10⁻¹ a 10⁻⁹ en SSF a 25°C, se sembraron por triplicado muestra de las diluciones 10⁻³, 10⁻⁵, 10⁻⁷ y 10⁻⁹ de cada muestra con asa por estría, en agar Carboximetilcelulosa (CMC) al 1%. Crecimiento de 24 a 48 horas a 25 °C. El concentrado de resultados se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Crecimiento de colonias a partir del aislamiento primario.

CLAVE DE LA MUESTRA	DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA GENERAL DE COLONIAS (SE PRESENTAN EN ORDEN DE MAYOR A MENOR PREDOMINIO)
HC	Colonias blancas, cremosas, regulares e irregulares, elevadas; colonias verde-amarillo regulares e irregulares, cremosas, elevadas; colonias transparentes, cremosas, elevadas; micelios algodonosos verdes, blancos y negros; micelios radiados verdes; colonias rojizas elevadas y planas cremosas.
TM	Colonias blancas, cremosas, regulares, elevadas; colonia amarillentas, verdes y naranjas regulares, elevadas; colonia transparentes regulares e irregulares elevadas, cremosas; micelio radiado verde y micelio esponjoso blanco y verde.
SA	Colonias blancas, cremosas, regulares, elevadas y planas; colonia transparentes, regulares, cremosas, elevadas; colonia verdosas regulares, cremosas, planas; micelio algodonoso verde blanco y negro.
TA	Colonias blancas, cremosas, irregulares y regulares, elevadas planas; colonias transparentes, regulares, planas, cremosas; colonia amarillentas, regulares, cremosas, elevadas; micelio algodonoso blanco con verde.
L	Colonias blancas, cremosas, regulares, elevadas y micelio esponjoso verde.

Evaluación cualitativa de la actividad celulolítica: se reveló con rojo Congo al 1% p/v cada una de las cajas de cultivo (348 cajas), presentándose los resultados de las muestras que presentaron dicha actividad en la tabla 3. Para calcular el halo de hidrólisis se midió con Vernier el diámetro de la colonia o micelio y el diámetro total de la colonia más el del halo, restándose el diámetro de la colonia al total.

Tabla 3. Actividad celulolítica cualitativa de las cepas aisladas en Medio CMC al 1%.

Clave/dilución 10 ^{-x}	Colonia micelio	Diámetros Colonia micelio	Características macroscópicas	Halo	Descripción
HC1-3-1	1 bacteria 2 micelio 3 bacteria	0.1 cm 1.2 cm 0.3 cm	3.0 cm 2.1cm 1.0 cm	2.0 cm 1.0 cm 0.7 cm	Colonia regular, blanca, plana, cremosa Micelio algodonoso verde Colonia cremosa, regular, elevada, blanca
HC4-3-3	1 micelio 2 bacteria 3 micelio	0.7 cm 0.7 cm 0.5 cm	1.6 cm 1.6 cm 1.6 cm	0.9 cm 0.9 cm 1.1 cm	Micelio radiado con centro gris colonia cremosa regular, elevada, blanca Micelio esponjoso blanco
TM3-3-1	1 bacteria 2 bacteria 3 micelio 4 micelio	0.1 cm 0.7 cm 0.8 cm 0.6 cm	0.3 cm 1.2 cm 1.1 cm 1.2 cm	0.2 cm 0.5 cm 0.3 cm 0.6 cm	Colonia regular blanca, elevada cremosa Colonia, anaranjada, irregular, cremosa Micelio radiado centro verde Micelio algodonoso blanco*
HC1-7-3	1 micelio	0.8 cm	1.6 cm	0.8 cm	Micelio algodonoso verde

Clave/dilución 10 ^{-x}	Colonia o micelic	Diámetros Colonia micelio	Características macroscópicas	Halo	Descripción
TM3-3-2	1 micelio	0.5 cm	1.0 cm	0.5 cm	Micelio radiado verde
HC4-5-1	1 micelio 2 bacteria 3 bacteria	0.6 cm 0.3 cm 0.1 cm	1.5 cm 0.5 cm 0.6 cm	0.9 cm 0.2 cm 0.5 cm	Micelio algodonoso verde Colonia blanca cremosa, regular, elevada Colonia irregular, cremosa, blanca, elevada
HC1-5-1	1 micelio 2 bacteria 3 micelio	0.3 cm 0.3 cm 0.6 cm	0.4 cm 0.5 cm 1.2 cm	0.1 cm 0.2 cm 0.6 cm	Micelio algodonoso verde <u>Colonia, cremosa, elevada, blanca, regular*</u> Micelio esponjoso verde
TM1-5-1	1 micelio	0.6 cm	1.6 cm	1.0 cm	Micelio esponjoso verde
TA1-5-2	1 micelio	1.5 cm	3cm	1.5 cm	Micelio esponjoso verde
TA1-7-1	1 micelio 2 colonia	0.6 cm 0.8 cm	1.0 cm 1.1 cm	0.4 cm 0.3 cm	Micelio esponjoso blanco centro verde Colonia cremosa, elevada, regular, blanca

ANEXO 2

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Medio de cultivo CMC al 1% P/V.

MEDIO DE CULTIVO	COMPOSICIÓN	(g/L)
Agar CMC 1% (p/v)	Carboximetilcelulosa	10
	Extracto de levadura	2.5
	Peptona universal	2.5
	Sulfato de amonio	0.5
	Cloruro de calcio	0.5
	Fosfato monobásico de potasio	0.1
	Fosfato dibásico de potasio	0.1
	Agar-agar	15
	Ajustar pH 7.0 +/- 0.2	

(Ramírez; 2003)

MEDIO DE CULTIVO	COMPOSICIÓN	(g/L)
Agar Papel	Levadura	2.5
	Peptona	2.5
	Sulfato de Amonio	0.5
	Cloruro de calcio	0.5
	Fosfato monobásico de sodio	0.1
	Fosfato dibásico de sodio	0.1
	Papel bond con tinta	30
	Agar	15

En su caso usar agar nutritivo siguiendo las instrucciones de cada proveedor y adicionar el papel bond con tinta

Preparación de reactivos para cuantificación de glucosa.

A. Reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS):

1. Disolver 1.6 g de Hidróxido de Sodio en agua destilada.
2. Adicionar 30 g de Tartrato de Sodio y Potasio.
3. Adicionar un 1 g Ácido 3-5 Dinitrosalicílico.
4. Aforar a 100 mL con agua destilada y agitar por 12 hrs en frasco ámbar.
5. Filtrar si es necesario y guardar a temperatura ambiente protegido de la luz.

B. Solución patrón de glucosa:

1. Pesar 1 g de Glucosa anhidra, disolver en agua destilada.
2. Aforar a 500 mL y guardar en frasco ámbar a 4 °C.

C. Preparación de las soluciones de concentración conocida 0.5-2g/L:

CONCENTRACION g/L	SOLUCION CONCENTRADA DE GLUCOSA EN mL	AGUA DESTILADA mL
0.5	0.5	1.5
0.7	0.7	1.3
1	1	1
1.5	1.5	0.5
1.7	1.7	0.3
2	2	0

D. Preparación de la curva de calibración y muestra:

1. De cada sistema anterior o muestra pipetear 0.5 mL a un tubo de ensayo.
2. Agregar 0.5 mL de reactivo DNS, mezclar y llevar a ebullición por 5 minutos a baño María.
3. Enfriar, adicionar 5 mL de agua destilada a cada sistema, mezclar y leer a 540 nm. Usar como blanco 0.5 mL de agua destilada y realizar el proceso descrito. (Canul; 2010)

Crioconsevacion de cepas:

1. Realizar examinación macroscópica de las colonias de crecimiento de 24 a 48 hrs.
2. Si se observan cultivos puros (1 solo tipo de colonia), realizar revisión microscópica con tinción de Gram para verificar la pureza de la cepa.
3. Preparar del Nefelómetro de Mc Farlan.
4. Preparar caldo CMC al 1% p/v con los reactivos para bacterias aerobias ya anaerobias facultativas por separado.
5. De cada cepa seleccionada hacer una suspensión igualando al tubo uno del nefelómetro en 2ml de medio.
6. Transferir a crioviales cada cepa ($3,0 \times 10^8$ de UFC /ml) aun volumen de .6 mL al 15% de glicerol.
7. llevar inmediatamente -20 °C.
(Sanchez - Leal & al., 2005)