



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA
CELULASA OBTENIDA Y PURIFICADA DE *Bacillus subtilis*
CRECIDO EN LOS SUSTRATOS CASCARILLA DE ARROZ,
CASCARILLA DE AVENA Y ZURO.**

AUTOR: RUEDA PILLAJO, ESTEFANI ALEXANDRA

DIRECTOR: DR. ÁVALOS, RODRIGO

CODIRECTOR: DR. CHIRIBOGA, CARLOS

SANGOLQUÍ

2015

CERTIFICACIÓN

Dr. Rodrigo Avalos

Dr. Carlos Chiriboga

Declaro que:

Certifican:

El proyecto de grado denominado *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CELULOSA OBTENIDA Y PURIFICADA DE Bacillus subtilis* CECREDO EN LOS SUSTRATOS CASCARILLA DE ARROZ, CASCARILLA DE AVENA Y ZURO,

Que el trabajo titulado: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CELULOSA OBTENIDA Y PURIFICADA DE *Bacillus subtilis* CECREDO EN LOS SUSTRATOS CASCARILLA DE ARROZ, CASCARILLA DE AVENA Y ZURO**, fue realizado en su totalidad por la Srta. ESTEFANI ALEXANDRA RUEDA PILLAJO como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

09 DE FEBRERO DEL 2015



Alexandra Rueda Pillajo



Dr. Rodrigo Ávalos

DIRECTOR



Dr. Carlos Chiriboga Novillo

CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

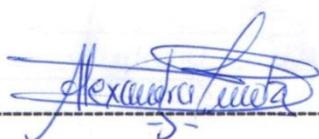
ESTEFANI ALEXANDRA RUEDA PILLAJO

Declaro que:

El proyecto de grado denominado EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CELULASA OBTENIDA Y PURIFICADA DE *Bacillus subtilis* CRECIDO EN LOS SUSTRATOS CASCARILLA DE ARROZ, CASCARILLA DE AVENA Y ZURO, ha sido desarrollado en base a una investigación exhaustiva, respetando los derechos intelectuales de terceros, conforme a las citas que constan en el texto cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía.

Consiguientemente este trabajo es de mi autoría.

SANGOLQUÍ, 09 DE FEBRERO DEL 2015.



ESTEFANI ALEXANDRA RUEDA PILLAJO

AUTORIZACIÓN

ESTEFANI ALEXANDRA RUEDA PILLAJO

Autorizo que:

El proyecto de grado denominado EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CELULASA OBTENIDA Y PURIFICADA DE *Bacillus subtilis* CRECIDO EN LOS SUSTRATOS CASCARILLA DE ARROZ, CASCARILLA DE AVENA Y ZURO, sea publicado en la biblioteca virtual de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

SANGOLQUÍ, 09 DE FEBRERO DEL 2015.

Alexandra Rueda



ESTEFANI ALEXANDRA RUEDA PILLAJO

DEDICATORIA

Con todo mi cariño y mi amor a Dios mi guía bajo el cielo, mi fortaleza en medio de la debilidad, a mi mayor bendición mis padres Edison Rueda y Gloria Pillajo por su paciencia, comprensión y amor, pues hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, a mi hermana Elizabeth por darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento eterno.

Alexandra Rueda.

AGRADECIMIENTO

A Dios mi guía, mi fortaleza, mi corazón agradecido por la vida, la inteligencia y la sabiduría para saber actuar en cada etapa y permitirme llegar a cumplir un objetivo en mi formación académica.

A mis padres Edison y Gloria, que me han formado como una mujer de éxito.

A mi hermana Elizabeth mi estrecha colaboradora.

Al Dr. Carlos Chiriboga y al Dr. Rodrigo Ávalos que han colaborado en el presente trabajo por su motivación, apoyo, ánimo y la confianza en mí depositada, por compartir conmigo sus lecciones y experiencias, formándome como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida. Gracias por su cariño y amistad.

A mis amigos, Jonathan Reinoso, Ing. Juan Haro, Ing. Hugo Bonifaz, gracias por formar parte de mi camino, por su apoyo y ayuda incondicional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO	vi
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
CAPITULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema.....	1
1.2. Justificación del problema.....	2
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. Objetivo General	4
1.3.2. Objetivos Específicos.....	4
1.4. Marco teórico.....	5
1.4.1. <i>Bacillus subtilis</i>	5
1.4.2. Clasificación Científica.....	6
1.4.3. Enzimas.....	6
1.4.4. Celulasa.....	8
1.4.5. Sustratos Utilizados	11
1.4.6. Método Discontinuo	16
CAPITULO 2	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
2.1. Materiales	20
2.2. Ubicación Geográfica	20
2.3. Dilución, Aislamiento, Purificación e Identificación de <i>Bacillus subtilis</i>	21
2.3. Crecimiento de la bacteria en tres tipos de sustratos.....	27
2.4. Extracción complejo enzimático.....	29
2.5. Purificación enzimática.....	31
2.6. Análisis de la información.....	35

CAPÍTULO 3	37
RESULTADOS	37
3.1. Dilución, Aislamiento, Purificación e Identificación de <i>Bacillus subtilis</i>	37
3.2. Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> en los sustratos de estudio.....	40
3.3. Evaluación de la actividad enzimática	40
CAPITULO 4	55
DISCUSIÓN	55
CAPITULO 5	59
CONCLUSIONES.....	59
CAPITULO 6	60
RECOMENDACIONES	60
CAPITULO 7	61
BIBLIOGRAFÍA	61
SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	64
GLOSARIO.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Preparación curva de calibración	34
Tabla 2: Cuantificación de <i>Bacillus subtilis</i>	39
Tabla 3: Absorbancias de la curva de calibración.....	39
Tabla 4: Zuro	41
Tabla 5: Cascarilla de Avena	41
Tabla 6: Cascarilla de Arroz.....	42
Tabla 7: Absorbancia de la velocidad de reacción.....	43
Tabla 8: Dobles recíprocos de la velocidad de reacción.....	48
Tabla 9: Absorbancia de la velocidad de reacción purificada.....	50
Tabla 10: Dobles recíprocos de la velocidad de reacción purificada.....	53
Tabla 11: Resumen de la purificación de Celulasa con sulfato de amonio.....	56
Tabla 12: Evaluación de los parámetros cinéticos de la Enzima Celulasa ($V_{m\acute{a}x}$; K_{cat} , A_e) sobre el sustrato específico (CMC).....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Gráfica del modelo Michaelis - Menten (Primo, 2007).....	8
Figura 2: Degradación enzimática de la celulosa (ArgenBio, 2007).	9
Figura 3: Pared celular de una planta (Beg & Kapoor, 2000).....	9
Figura 4: Estructura molecular de la celulosa (Lutzen, et al, 1983).....	10
Figura 5: Regiones ultravioleta y visible del espectro y tipos de bandas de absorción más frecuentes (Olsen, 1990).....	18
Figura 6: Curva de calibración con n=5 (Villanueva & Dorsal, 2008).	19
Figura 7: Dilución seriada	21
Figura 8: A = Crecimiento masivo en TSA de <i>Bacillus subtilis</i> , B = crecimiento en PDA de <i>Bacillus subtilis</i> con la técnica de aislamiento por estría.	22
Figura 9: a - Crecimiento en agar de desarrollo (PCA); b - crecimiento en agar nutriente (AN); c - crecimiento homogéneo dilución (10 – 5);.....	23
Figura 10: a - Prueba de crecimiento anaeróbico; b - cultivo en caldo Voges Proskauer.....	24
Figura 11: Prueba de Voges Proskauer; A = reacción negativa, B = reacción positiva	24
Figura 12: Identificación de la cepa pura de <i>Bacillus subtilis</i>	25
Figura 13: a - Siembra en caldo nutriente; b - condiciones de crecimiento.....	25
Figura 14: a - Posición de muestras en el espectrofotómetro; b - cuantificación crecimiento microbiano; c - escala Mayor de Mc.Farland; d - Identificación escala.	26
Figura 15: Selección de los discos para crio conservación.	27
Figura 16: a - molienda de la cascarilla de arroz. b - Muestra madre cascarilla de arroz; c - Cascarilla de avena; d - Zuro de maíz original, e - Zuro de maíz triturado.....	28
Figura 17: a - Sobrenadante después del homogenizado y ultra centrifugado; b - Filtración en papel filtro; c - Filtrado de zuro; avena y arroz; d - Filtración en milipore con filtros de membrana 0,45 μm	30
Figura 18: a - Complejo Enzimático; b - Cuantificación con el espectrofotómetro.	31
Figura 19: a - Alícuotas de cada uno de los complejos enzimáticos; b - Formación de Cristales.	31
Figura 20: a - Ensamble de electroforesis; b - Marcador molecular; c - Muestras	33
Figura 21: Reactivo Biuret	34
Figura 22: a-b - Cepa pura de <i>Bacillus subtilis</i> , c - <i>Pseudomona fluorescens</i> , d - <i>Pseudomona putida</i>	37
Figura 23: a - Crecimiento anaeróbico negativo para <i>Bacillus subtilis</i> ; b - Test de voges proskauer positivo para <i>Bacillus subtilis</i>	38
Figura 24: Curva de calibración.	39
Figura 25: Representación gráfica de la velocidad de reacción para el modelo de Michaelis – Menten.	44
Figura 26: Identificación de la Celulasa en gel de poliacrilamida SDS – PAGE, en base al marcador molecular SeeBlue.	46

Figura 27: Representación gráfica de linealización Lineweaver- Burk.....	48
Figura 28: Representación gráfica de la velocidad de reacción para el modelo de Michaelis – Menten	51
Figura 29: Representación gráfica de linealización Lineweaver – Burk	54

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1: Ecuación de Michaelis – Menten	7
Ecuación 2 Transformación a UFC.....	38
Ecuación 3: Ecuación correspondiente al figura 25.	44
Ecuación 4: Ecuación correspondiente al figura 29.	51

RESUMEN

Actualmente existe gran acumulación de desechos agroindustriales en la zona costera del Ecuador debido al consumo de maíz, avena y arroz, se estima que existe una alta contaminación por el uso de técnicas rudimentarias al procesar dichos residuos. Por tal razón, esta investigación se enfocó en seleccionar una cepa bacteriana productora de Celulasa a partir de la fermentación semi sólida de residuos agroindustriales tales como: cascarilla de *Oryza sativa* (arroz), cascarilla de *Avena sativa* (avena) y *Zea mays* (zuro) a nivel laboratorio, utilizando técnicas de aislamiento e identificación de bacterias se alcanzó la identificación y crioconservación de *Bacillus subtilis* en medio microbiológico específico para su género, posteriormente se realizó la propagación masiva de la bacteria para el sometimiento en los sustratos de estudio, en condiciones óptimas para la producción de la Celulasas. Para la evaluación de la enzima se utilizó un sustrato específico (CMC) para Celulasa en el mismo se evaluaron los parámetros cinéticos correspondientes a la enzima y al CMC, además se estableció el grado de pureza y la actividad específica en el extracto enzimático sin purificar y purificado con sulfato de amonio al 50%; conjuntamente de estos parámetros cinéticos se determinó el peso molecular relativo con el marcador molecular SeeBlue y un medio regulador citrato, indicando un tiempo de vida promedio de 8 días en cascarilla de arroz mientras que de 10 días en zuro y cascarilla de avena.

PALABRAS CLAVES:

- **CELULASA**
- **ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**
- **PURIFICACIÓN**
- **GRADO DE PUREZA**
- **ACTIVIDAD ESPECIFICA**

ABSTRACT

At present there is a big accumulation of agro-industrial waste in the coastal area of Ecuador due to consumption of corn, oats and rice, it is estimated that this high contamination level are caused by the use of rudimentary techniques processing of such waste. For this reason, this research is focused on selecting a cellulose producer bacterial strain from the semi solid fermentation of agro-industrial semi solid waste such as husks *Oryza sativa* (rice), husk *Avena sativa* (oats) and *Zea mays* (cob) at laboratory level. Using techniques of isolation and identification of bacteria, the identification and cryopreservation to *Bacillus subtilis* between area microbiologically specific for gender were achieved, then, the mass propagation of bacteria for subjecting substrates to study was made. For the evaluation of the enzyme it was used a specific substrate for cellulose, and in them the specific kinetic parameters agreed to the enzyme and the CMC were evaluated, furthermore there were also assessed the degree of purity and specific activity in the enzyme crude extract, and it was established and purified sulfate 50% ammonium; together these cinetic parameters with the relative molecular weight and molecular marker SeeBlue regulator citrate medium was determined, indicating an average life time of 8 days in rice husk while 10 days cob and oat hulls.

Keywords:

- **CELLULOSE**
- **ENZYME ACTIVITY**
- **PURIFICATION**
- **PURITY DEGREE**
- **SPECIFIC ACTIVITY**

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

Esta investigación permitió aislar, evaluar la producción y determinar el tiempo adecuado de crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis* en los sustratos agroindustriales: cascarilla de arroz, cascarilla de avena y zuro (tusa de maíz). El tratamiento de estos residuos, aplicando la biotecnología permitirá establecer la reducción de los índices de contaminación y de manera colateral disponer de nuevas fuentes de enzimas que se encuentran en los extractos de estos fermentos.

Las enzimas son catalizadores biológicos que ayudan a acelerar las reacciones metabólicas, razón por la cual pueden ser aprovechadas en la industria alimenticia, papelería, textil, etc. en base a los resultados obtenidos, se evaluó el extracto enzimático que se obtiene de cada sustrato en donde se hizo crecer la bacteria para su respectiva evaluación.

En el extracto enzimático se encuentra una variedad de enzimas; pero el tema de interés en este estudio fue la **Enzima Celulasa** por su amplia aplicación en la industria. Además de las bondades que presenta esta Enzima (Celulasa), se puede convertir como macromolécula biológica degradadora de papel en desuso, blanqueamiento de aguas contaminadas, reavivamiento de colores, lo cual reduciría los costos de la producción generando un rédito económico y la creación de digestores alimenticios mediante la reutilización de los desechos agroindustriales.

Considero que esta investigación será la base para el estudio de los desechos agroindustriales como nueva fuente en la producción de enzimas que no han sido tomados en cuenta dentro del proceso de reutilización.

Adicionalmente, este estudio no sólo implica la cuantificación de la enzima, sino también de la bacteria *Bacillus subtilis* y de los sustratos en estudio (cascarilla de arroz, cascarilla de avena, zuro) fuentes de esta macromolécula (Celulasa). Como complemento a esta investigación se determinó la calidad enzimática en conexión con los sustratos y su posible aplicación biotecnológica.

1.2. Justificación del problema

La Celulasa es una enzima que pertenece al grupo de las glucosidasas, útiles para la degradación de la pared celular que en su estructura tiene enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4) - D- glucosa. Esta enzima es de amplia aplicación en la industria alimenticia, humana, animal e industrial; con alta aplicación en la formulación de dietas en el área avícola, debido al elevado costo de alimentación de las aves; la inclusión de esta enzima en la formulación de las dietas permitirá obtener mayor conversión alimenticia acompañada de la disminución de costos en la producción de pollos de engorde.

He ahí la importancia en la aplicación de la biotecnología para la producción de enzimas; obteniendo nuevas fuentes de enzimas como son los desechos agroindustriales tratados (fermentados) con *Bacillus subtilis* para la obtención de Celulasa y su posterior aplicación en la industria, así como en la elaboración de un suplemento hepático o como digestor para rumiantes.

Para obtener una alta producción de Celulasas, es necesario que los sustratos en el cual actúa *Bacillus subtilis* sea rico en celulosa, debido a esta propiedad se consideró tres desechos agroindustriales para su estudio y comparación, los mismos que se seleccionaron en la zona industrial de la región costa del Ecuador.

La industria alimenticia, en la región costa del país genera toneladas de desechos agroindustriales, los mismos que son utilizados para múltiples actividades sin darles el uso y el valor adecuado a cada uno de estos, los que terminan siendo una problemática ambiental en la contaminación de ríos (sobrenadante), suelo (bagazo) y aire (incineración); por medio de esta investigación está buscando una alternativa de uso aplicando la biotecnología en la reutilización, de esa manera minimizando los niveles de contaminación y utilizando hasta el mínimo recurso de materia prima.

Cabe recalcar que la cascarilla de arroz posee en su contenido fibra (celulosa) y silicio (Valverde, 2009). Razón por la cual, nace la preocupación por la correcta gestión de residuos, así como la búsqueda de nuevas alternativas aplicando la biotecnología para su reutilización y valoración.

La cascarilla de avena producto de desecho de la industrialización de la avena en el litoral ecuatoriano, gran parte es utilizada como forraje en la alimentación animal en condiciones tradicionales durante las épocas de carencia de forrajes verdes.

El Zuro, al poseer en su composición compuestos químicos como la celulosa, xilano, peptinas, etc. lo convierte en un medio óptimo para mejorar la producción de Celulasas, y otras enzimas de interés industrial. Este residuo es desechado por esparcimiento sobre la tierra, por incineración al aire libre o mezclado con otros alimentos para la alimentación ganadera, sin tener un rédito óptimo.

La búsqueda de alternativas, mediante la selección y reintroducción del microorganismo a sustratos en situación de desecho, constituye una atractiva aplicación presentando la utilidad de la bacteria productora de Celulasas en diferentes sustratos cuyo beneficio es el empleado en la industria alimenticia ganadera.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Evaluar la actividad enzimática de la Celulasa, obtenida y purificada de *Bacillus subtilis* crecidos en los sustratos: Cascarilla de *Oryza sativa* L (arroz), Cascarilla de *Avena sativa* (avena) y *Zea mays* L (Zuro de maíz), a nivel de laboratorio y determinar su aplicación biotecnológica.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar el tiempo óptimo de máxima producción de enzima Celulasa y comparar con los sustratos en estudios para posterior escalado piloto.
- Evaluar la actividad máxima y los parámetros cinéticos de la Enzima Celulasa ($V_{m\acute{a}x}$; K_m ; K_{cat}) en el sustrato específico Carboximetil Celulosa (CMC).
- Cuantificar el Grado de pureza (GP) y la actividad específica (AE) de la Celulasa extraída y purificada.

1.4. Marco teórico

1.4.1. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis es una bacteria Gram Positiva, localizada comúnmente en el suelo, agua y aire. Descubierta por Christian Gottfried Ehrenberg en el año de 1835 llevando el nombre de "*Vibrio subtilis*" años más tarde en 1872 cambia su nombre original por "*Bacillus subtilis*" por Ferdinand Cohn (EMBL, 2009).

Existe una amplia gama de cepas bacterianas productoras de Celulasas, estas son específicamente del genero *Bacillus* en las especies *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus natto*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans* y *Bacillus firmus*.

En condiciones de laboratorio, es posible la aclimatación para lograr la transmisión genética necesaria para la formación de Celulasas del microorganismo de estudio crecido en desechos agroindustriales como sustrato.

La bacteria es conocida por varios nombres como "*Hay bacillus*, *grass bacillus* or *Bacillus globigii* (Krik, 2009) *Bacillus subtilis* tiene la habilidad para formar una resistente endospora protectora, permitiendo al microorganismo tolerar condiciones ambientales extremas, así como también ambientes secos (Krik, 2009).

La bacteria *Bacillus subtilis* es aerobia, misma que al realizar la prueba de catalasa da como positiva la reacción, porque esta secreta la enzima catalasa, la cual posee citocromos que son proteínas que participan en el transporte de energía química (Espinosa, 2005).

1.4.2. Clasificación Científica

En el año de 1835 fue identificado y reconocido por Ehrenberg y rectificado su nombre por Cohn en 1872.

Bacillus subtilis

Reino: Mónera

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: *Bacillus*

Especie: *Bacillus subtilis*

(De Castro, 2010).

1.4.3. Enzimas

Son compuestos de origen biológico con capacidad catalítica que aceleran las reacciones metabólicas participando en mecanismos de regulación anabólica y catabólica.

Actividad enzimática

La acción catalítica de una enzima, o su actividad, se mide cuantificando el incremento de la velocidad de la reacción en condiciones perfectamente definidas, es decir midiendo la diferencia del recambio entre la reacción catalizada y la reacción no catalizada en un tiempo determinado.

Se debe tener en consideración 3 factores: 1) sustrato transformado; 2) tiempo de transformación y 3) cantidad de enzima.

Unidad Internacional (UI)

Unidad internacional de enzima, a la cantidad de enzima que, en condiciones óptimas de temperatura, pH y fuerza iónica, es capaz de transformar en sus productos respectivos un micromol de sustrato en un minuto (Núñez De Castro, 2001).

Actividad específica

La actividad específica es el número de UI por mg de proteína (sea de enzima pura o de una preparación) (Primo, 2007).

Katal

Se define el katal como la cantidad de enzima que, en condiciones óptimas, es capaz de transformar un mol de sustrato en un segundo (Núñez De Castro, 2001).

Número de recambio

K_{cat} o número de recambio es el número de moles de sustrato transformado por mol de enzima en unidad de tiempo (Núñez De Castro, 2001).

Cinética de Michaelis - Menten

La cinética de Michaelis – Menten supone que tanto el sustrato como la enzima son solubles y se encuentran mezclados de forma homogénea.

Para un único sustrato (S) y un único producto (P) se aplica el siguiente esquema:



$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{k_m + [S]}$$

Ecuación 1: Ecuación de Michaelis – Menten

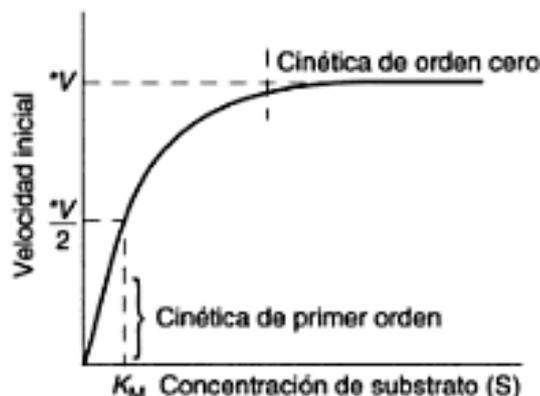


Figura 1: Gráfica del modelo Michaelis - Menten (Primo, 2007).

Donde V_0 es la velocidad inicial de reacción correspondiente a la concentración de sustrato (S): $V_{m\acute{a}x}$ es la velocidad máxima alcanzable y K_m es la constante de Michaelis característico del sustrato.

Cuando una enzima actúa sobre distintos sustratos, el k_m más pequeño indica mayor afinidad del enzima por ese sustrato.

1.4.4. Celulasa

Celulasa es una enzima hidrolítica producida por: hongos, bacterias y protozoos, en ocasiones por termitas y simbioses intestinales microbianos de otras termitas, que poseen la capacidad de catalizar celulolisis (descomposición de la celulosa). Algunos tipos de Celulasas toman el nombre de exocelulase (Figura 2), se refiere a la actividad exo-celulasa y posee la acción sinérgica debido a la mayor producción de azúcar (Artigos, 2012).

Reacción: hidrolisis del enlace glucosídico $\beta (1-4) D - glucosa$ en celulosa, liquenina y polisacáridos $\beta - D - glucanos$.

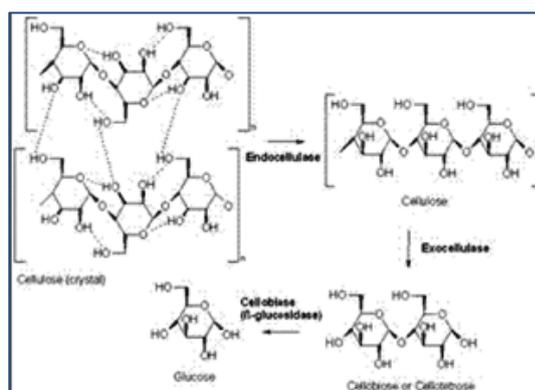


Figura 2: Degradación enzimática de la celulosa (ArgenBio, 2007).

1.4.4.1. Celulosa

La celulosa es el principal polisacárido natural encontrado en la estructura de la pared celular de plantas (Figura 3), en una célula vegetal joven se encuentra formando por un 40% y 50% en madera, en abundantes cantidades se encuentra en el algodón con 90% aproximadamente.

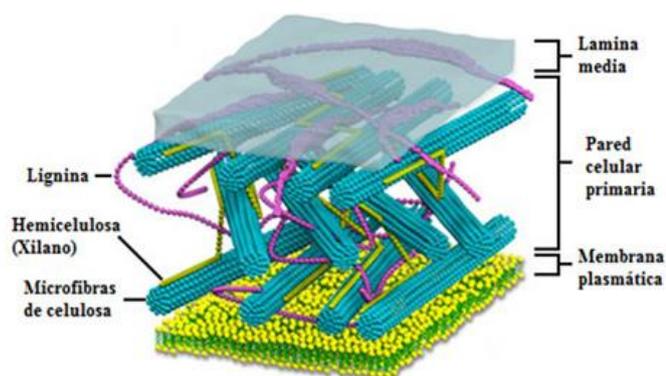


Figura 3: Pared celular de una planta (Beg & Kapoor, 2000).

Su estructura química se define como un polisacárido lineal formado por residuos de D - glucosa unidos por enlaces glucosídicos (β -1,4) (Figura 4).

La estructura β , permite a la celulosa formar cadenas lineales y extensas, cuya unión son los enlaces de puentes de hidrógeno originando microfibrillas, las mismas que toman el nombre de regiones cristalinas, cuyo orden es estratégico y altamente ordenado, esta estructura le otorgan las características de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático (Lutzen, et al, 1983).

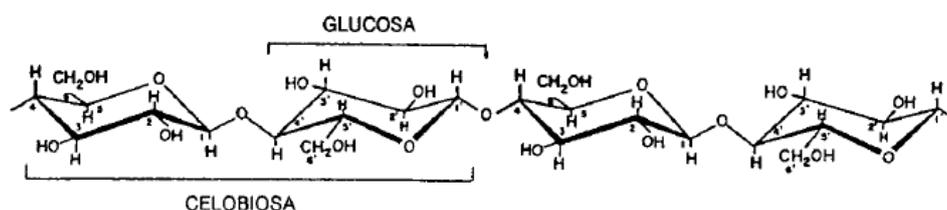


Figura 4: Estructura molecular de la celulosa (Lutzen, et al, 1983).

Los animales no pueden utilizar a la celulosa directamente como fuente de energía, debido a que no cuentan con las enzimas necesarias para lograr la ruptura de los enlaces β -1,4-*glucosídicos*, la enzima encargada de romper dichos enlaces es la Celulasa que se encuentra en el intestino de algunos rumiantes, herbívoros y termitas, al lograr hidrolizar la Celulasa quedan libres monosacáridos como la D - glucosa que son empleadas posteriormente como fuente de energía.

1.4.4.2. Aplicación de la Enzima Celulasa

Son de gran utilidad en la industria, como por ejemplo enzimas en el desteñido de telas ya que usan para remover el color azul índigo, evitando el uso de la piedra pómez, con la reducción de este material se produce menor daño a la tela y menor desgaste de las lavadoras.

Otro campo de aplicación son los detergentes, estas enzimas tienen la capacidad de degradar las microfibrillas que se separan parcialmente de las fibras principales, otorgando a las mismas una superficie suave y conservando el color original.

En la industria alimenticia las Celulasas son útiles para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de néctar, extracción de aceites comestibles.

Grado de pureza

El grado de purificación, se basa en el valor de actividad específica alcanzado en cada paso de purificación. Si se considera la actividad específica inicial como unidad de purificación, el grado de purificación de cada etapa se calcula haciendo el cociente entre la actividad específica de dicha etapa y la de la primera etapa (FCEN, 2010).

$$GP = \frac{Ac_0}{Ac_f} = \frac{\text{Actividad específica inicial}}{\text{Actividad específica de la etapa}}$$

1.4.5. Sustratos Utilizados

1.4.5.1. Cascarrilla de *Oryza sativa* L (arroz)

El arroz es el cultivo más extenso del Ecuador, el mismo ocupa más de la tercera parte de la superficie de productos transitorios del país. De acuerdo al Censo Nacional Agropecuario del 2002, el arroz anualmente es sembrado aproximadamente en 340 mil hectáreas cultivadas por 75 mil

unidades de producción agropecuaria; las cuales, el 80% son productores de hasta 20 hectáreas (FAO). Uno de los productos alimenticios más consumidos por la sociedad ecuatoriana es el arroz, dejando de lado su envoltura conocida como cascarilla de arroz (Gil, 2010).

La mayor área sembrada de arroz en el país está en la Costa, también se siembra en las estribaciones andinas y en la Amazonia pero en cantidades poco significantes. La mayor distribución abarca 2 provincias Guayas y Los Ríos, las mismas que representa el 83% de la superficie sembrada de la gramínea (MAGAP & SIGAGRO, 2009). De acuerdo al censo 2005 otras provincias importantes en el cultivo de esta gramínea son Manabí con 11%, Esmeraldas, Loja y Bolívar con 1% cada una; mientras que el restante representa el 3% se distribuye en otras provincias (INEC, 2005-2008).

El arroz, constituye uno de los productos con alto consumo en la alimentación diaria del ser humano en todo el mundo, por lo cual genera grandes cantidades de residuos. Un rendimiento anual de producción mundial de 422 millones de toneladas, un 20% aproximadamente es cáscara seca no comestibles, conocido como basura (Jung, 2013).

La cascarilla de arroz es un subproducto de la industria arrocera, lo cual se encuentra en grandes cantidades en la región productora del país, posee propiedades como sustrato hidropónico parcialmente carbonizada (Mafla, 2009).

Según Jung (2013), en Corea del Sur lograron extraer silicio de la cascarilla de arroz, lo cual presenta un gran potencial ya que logra comportarse como ánodo para bacterias, es decir su comportamiento será como un electrodo en el que se produce una reacción de óxido - reducción

Las propiedades físico-químicas son: sustrato orgánico de baja tasa de descomposición por lo que se lo reconoce como difícil degradación, liviano con baja densidad, alto volumen, buen drenaje y buena aireación (Basaure, 2008).

La cascarilla de arroz posee baja capacidad de retención de humedad, lo cual resulta un inconveniente en obtener de manera homogénea la misma humectabilidad en camas o bancadas (Jung, 2013).

La temperatura es un factor que influye en la pérdida de masa a temperaturas de 50°C y 55°C, cuando la temperatura se encuentra sobre los 150°C la pérdida de peso es cercana al 6% por la descomposición térmica. La segunda etapa térmica representa el 38% de pérdida de peso lo cual ocurre en temperaturas de 150°C - 375°C. La tercera etapa representa el 34% de pérdida de peso en temperaturas de 375°C - 550°C, los cuales corresponden al proceso de carbonización teniendo como resultado cenizas del 22% en peso, lo cual es representado por el contenido de sílice e impurezas inorgánicas en la cascarilla de arroz (Basaure, 2008).

Según Basaure (2008), los análisis químicos realizados por técnicas como fotometría de llama y gravimetría han determinado un 82% del material orgánico, y sus compuestos como carbón, alrededor del 17% de Sílice y un 1% de óxidos.

Características

Origen:	Vegetal
Dureza:	Grado Mohs 6-6,5
Presentación:	Granulada
Forma:	Redondeada
Color:	Amarillo
Poder de absorción:	Medio

(Ministerio de Minas y Energía, 1990).

1.4.5.2. Cascarilla de *Avena sativa* (avena)

La avena constituye uno de los cereales ricos en nutrientes, en sus inicios la producción de avena servía para la alimentación animal, con el avance industrial poco a poco ha aumentado la elaboración de productos para el consumo humano (UNAD, 2010).

La cascarilla de avena equivale al 30 y 40% de la estructura de grano, en su composición posee fibra, proteínas, vitaminas B, minerales, grasa y hierro (Kent, 1998)

La cascarilla está constituida por capas que cubren y protegen al endospermo y al germen, la capa es abundante en celulosa que forma parte de la fibra la cual no puede ser digerida por el organismo del ser humano (INCAP/OPS, 2003).

Características

Origen:	Vegetal-Gramíneas
Dureza:	Grado Mohs 7
Presentación:	Grano mediano
Forma:	Sub-redondeado
Color:	Amarillo blanquizco
Poder de absorción:	alto

(Aramburu, 2011).

1.4.5.3. *Zea mays L (zuro)*

El maíz es uno de los cultivos abrasivos de la región, el Zuro de maíz es un derivado del desgrano, el cual presenta diferentes graduaciones.

Es utilizado como sistema de Sand – Blast es decir sopeteo de abrasivo, el cual es limpiado estrictamente para la limpieza y pulido de placas metálicas, plásticas, vidrio o cerámica (Darwin, 2013).

Según Pedraza (2012), el mayor desperdicio de Zuro es a partir de cultivos de maíz, lo cual es desechado en miles de toneladas al año y del que pueden obtenerse hasta 200 L de alcohol por tonelada.

Características:

Origen:	Vegetal
Dureza:	Grado Mohs 4.5
Presentación:	Granulada
Forma:	Sub-angular
Color:	Dorado blanquizco
Poder de absorción:	alto.

(Darwin, 2013).

1.4.6. Método Discontinuo

1.4.6.1. Centrifugación

Es un método por el cual se logra separar líquidos de diferente densidad, es decir la separación de sólidos insolubles de partículas muy pequeñas difíciles de sedimentar empleándose la fuerza rotativa, la misma que permite la homogenización con una fuerza mayor que la de la gravedad, induciendo la sedimentación de los sólidos o de las partículas de mayor densidad, se cumple el principio de la fuerza es mayor que la gravedad (Valencia, 2010).

De acuerdo al fundamento se aplica un fuerte campo centrífugo, con el cual las partículas tenderán a desplazarse a través del medio en el que se encuentren con la aceleración, donde se hace referencia a la siguiente ecuación.

$$G.E = \text{velocidad angular}^2 * \text{radio de giro}$$

1.4.6.2. Filtración milipore

La filtración estéril se da con membranas Durapore Hydrophilic PVDF $0,45\mu m$, lo cual permite la separación física de acuerdo al tamaño del poro de la membrana, por medio de esta se determina la turbidez y el objetivo es la retención del microorganismo en la membrana.

1.4.6.3. Purificación enzimática

Las enzimas se encuentran formando mezclas complejas generalmente en el interior de las células, se pueden encontrar formando parte de agregados moleculares con otras enzimas, proteínas, ácidos nucleicos o lípidos, etc. Motivo por el cual es indispensable realizar el proceso de purificación, cuyos objetivos es la obtención de una máxima cantidad posible de enzima, mejorar las condiciones operativas con una buena actividad catalítica y evitar otras proteínas.

1.4.6.4. Precipitación con Sulfato de Amonio $(NH_4)_2SO_4$.

Una de las técnicas de purificación es la precipitación fraccionada con Sulfato de Amonio, aprovechando la solubilidad y el bajo costo de este compuesto; única para cada tipo de proteína, el proceso depende de aspectos como: la naturaleza bioquímica la cual controla la estabilidad y actividad específica, la utilización de la enzima a nivel industrial y la complejidad del proceso sobre costos tecnológicos.

La naturaleza bioquímica de la enzima, permite el mantenimiento de la actividad enzimática, la cual en ocasiones puede ser menos estable en cuanto a la permanencia de su actividad, lo que limita significativamente a la técnica.

1.4.7. Método continuo

1.4.7.1. Espectrofotometría

Técnica cuya finalidad es la interacción de moléculas con la radiación electromagnética, para la determinación de la concentración de un compuesto (Almeida, 2007).

Un espectro es obtenido cuando la absorción de luz es medida en función de una frecuencia o longitud, cuando presentan una región visible de 400 – 800 nm (Figura 5). La longitud de absorción de una molécula depende del cromóforo (Arenas & López, 2004).

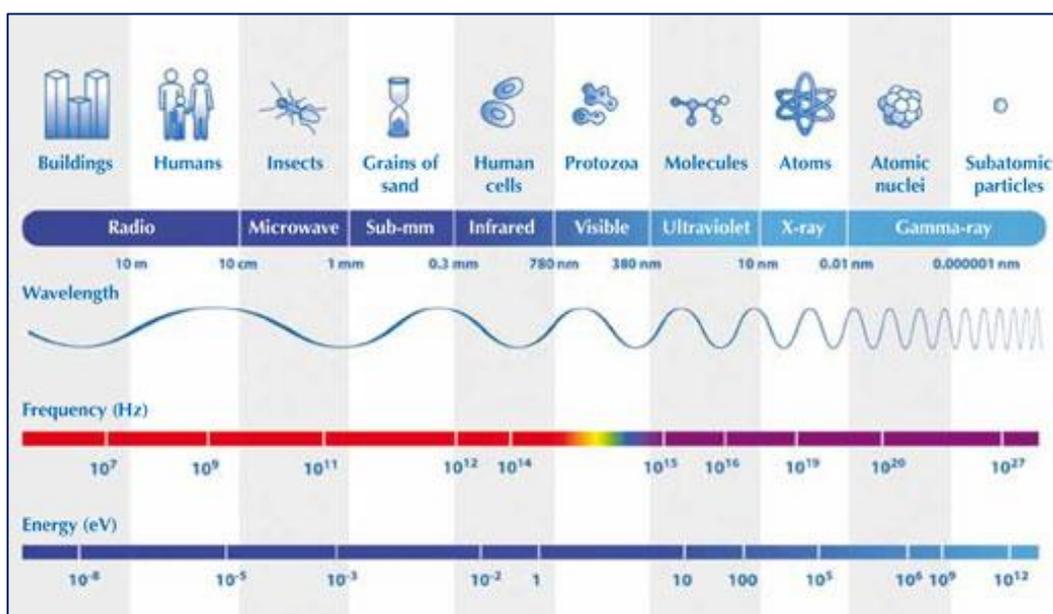


Figura 5: Regiones ultravioleta y visible del espectro y tipos de bandas de absorción más frecuentes (Olsen, 1990).

1.4.7.2. Curva de calibración

Es una representación gráfica de una señal que se mide en función de la concentración de un analito, siendo este un análisis cuantitativo.

Sin embargo, al ser también un método analítico permite obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración de un compuesto en una muestra, dentro de un determinado intervalo de trabajo. En el procedimiento se compara una propiedad del analito con la de estándares de concentración conocida del mismo analito (o de algún otro con propiedades muy similares a éste) (Figura 6). Para realizar la comparación se requiere utilizar métodos y equipos apropiados para la resolución del problema de acuerdo al analito que se desee determinar.

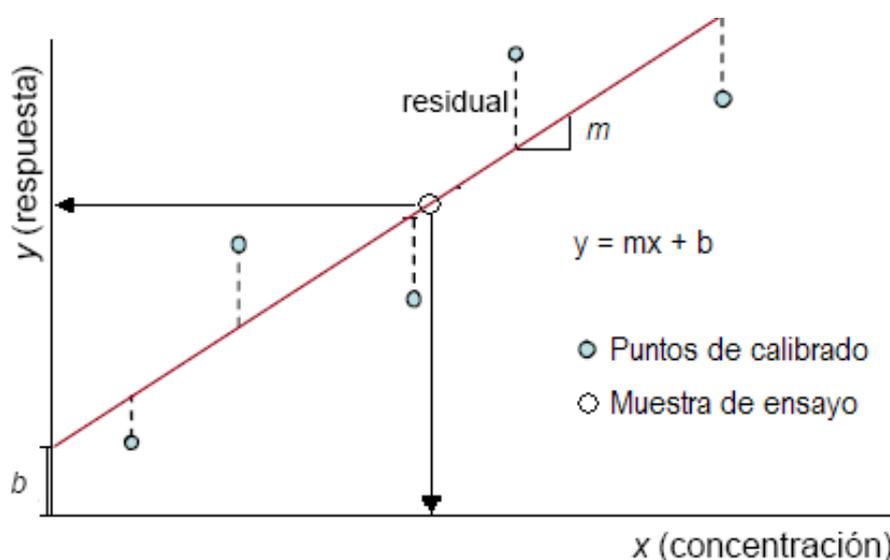


Figura 6: Curva de calibración con $n=5$ (Villanueva & Dorsal, 2008).

CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

En el desarrollo del estudio se utilizaron los siguientes materiales:

En la etapa de dilución, aislamiento, purificación e identificación de la bacteria *Bacillus subtilis* se utilizaron los siguientes materiales, tubos de ensayo (5 ml; 10 ml y 25 ml), asas de siembra, pipetas (1ml; 5ml; 10ml y 25 ml), gradilla, cajas Petri, matraz elenmeyer (250 ml y 500 ml), frascos tarados, frasco de esterilización, barras de agitación, vasos de precipitación, cubre y porta objetos, pipeta pasteur, piceta de agua destilada.

Etapa de crecimiento de la bacteria en los sustratos.

Se utilizaron frascos ambar (150 ml), tubos falcón (2,5 ml; 5 ml y 15 ml), balón aforado (50 ml; 250 ml y 500 ml), embudos, papel filtro, jeringa (5 ml y 10 ml), filtro de membrana (0,45 μ m), micropipetas (10 μ ; 100 μ y 1000 μ).

Los equipos que se utilizaron en las diferentes etapas fueron: balanza, horno de esterilización, hot plate, autoclave, agitador magnético, mechero bunsen, cámara de flujo laminar tipo IIA, incubadora, agitador orbital, vortex.

2.2. Ubicación Geográfica

El estudio y muestreo se realizó en la Parroquia San Fernando del Cantón Rumiñahui, de la Provincia Pichincha en la Hcda. El Prado de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, cuyas coordenadas al Oeste 78°25'00", latitud Sur 0°22'21" y Oeste 78°26'00", latitud Sur 0°23'46", asentadas en la Región Sierra, altitud 2748 msnm a 10 Km de Quito (Armas & Yandum, 1998).

2.3. Dilución, Aislamiento, Purificación e Identificación de *Bacillus subtilis*.

En la etapa de dilución, las muestras de suelo se recolectaron en la hacienda El Prado en tres diferentes tipos de cultivo: tierra de potrero, tierra de invernadero y tierra de cultivo de chocho, tomando una cantidad de 15g a los 30cm de profundidad, luego se llevó al laboratorio de Agrobiotecnología del IASA I, donde se realizó la dilución seriada con agua destilada hasta 10^{-6} , de acuerdo a la Figura 7.

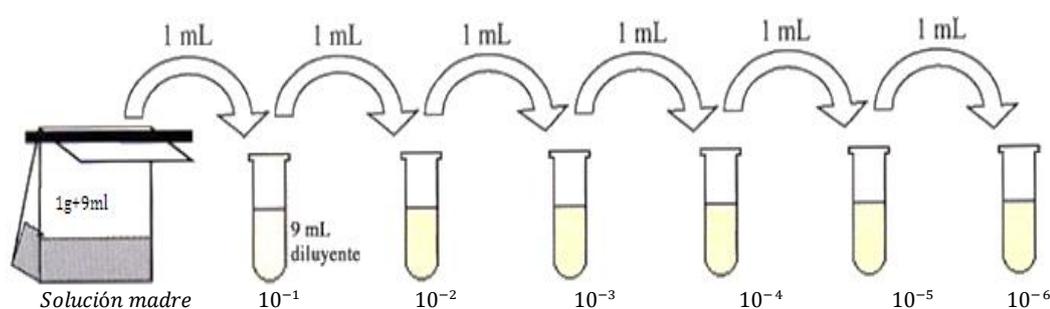


Figura 7: Dilución seriada

Consecutivamente se sembró de forma masiva (Figura 8) de las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} en medio TSA-MEDIA, luego se incubó a 37°C por 72 horas, y se eliminaron las muestras contaminadas. Posteriormente se seleccionaron las cajas de color rosáceo y las colonias individuales de crecimiento homogéneo, forma irregular y blanquecina, las mismas que se sembraron en medio Agar Papa Dextrosa (PDA) con la técnica de aislamiento por estría (Figura 8) finalmente fueron incubadas a 37°C durante 48 horas.

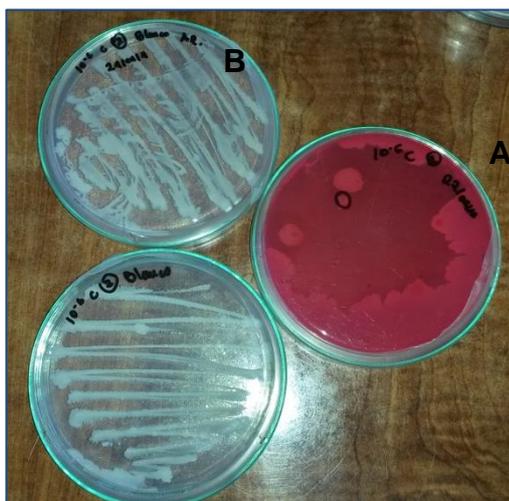


Figura 8: A = Crecimiento masivo en TSA de *Bacillus subtilis*, B = crecimiento en PDA de *Bacillus subtilis* con la técnica de aislamiento por estría.

Luego se seleccionaron las cepas ovoides de color blanquecino, estas cepas fueron sembradas en un medio específico para la identificación de colonias del género *Bacillus* (peptona de caseína, D (+) Glucosa, púrpura de bromocresol, Agar – agar) e incubadas a 37°C por 48 horas, las cajas fueron observadas con un transiluminador (FOTO/Phoresis) y se identificaron las cepas de *Bacillus subtilis* (cajas completas de color púrpura sin fluorescencia), *Pseudomona Fluorecens* (cajas parcialmente de color purpura con fluorescencia), *Pseudomona putida* (cajas de color amarillo, con fluorescencia).

Las colonias seleccionadas de *Bacillus* se inocularon con la técnica de siembra por estrías de aislamiento, en dos medios: agar de desarrollo (peptona de caseína, extracto de levadura, K_2HPO_4 , Agar) (Figura 9 a) y en Agar Nutriente adicionando una solución compuesta de 0,5% Glucosa, 7% de NaCl y 15% de Bacitracina (Figura 9 b), se incubaron a 37°C por 48 horas y se seleccionaron las colonias de color blanquecino que presentaron crecimiento homogéneo. Se identificaron las colonias de *Bacillus subtilis* cuyas características fueron circular alargada, con una elevación aplanada,

color blanquecino, cuyo borde no sea estrellado al producir por estrías y crecimiento homogéneo (Figura 9 c, d).

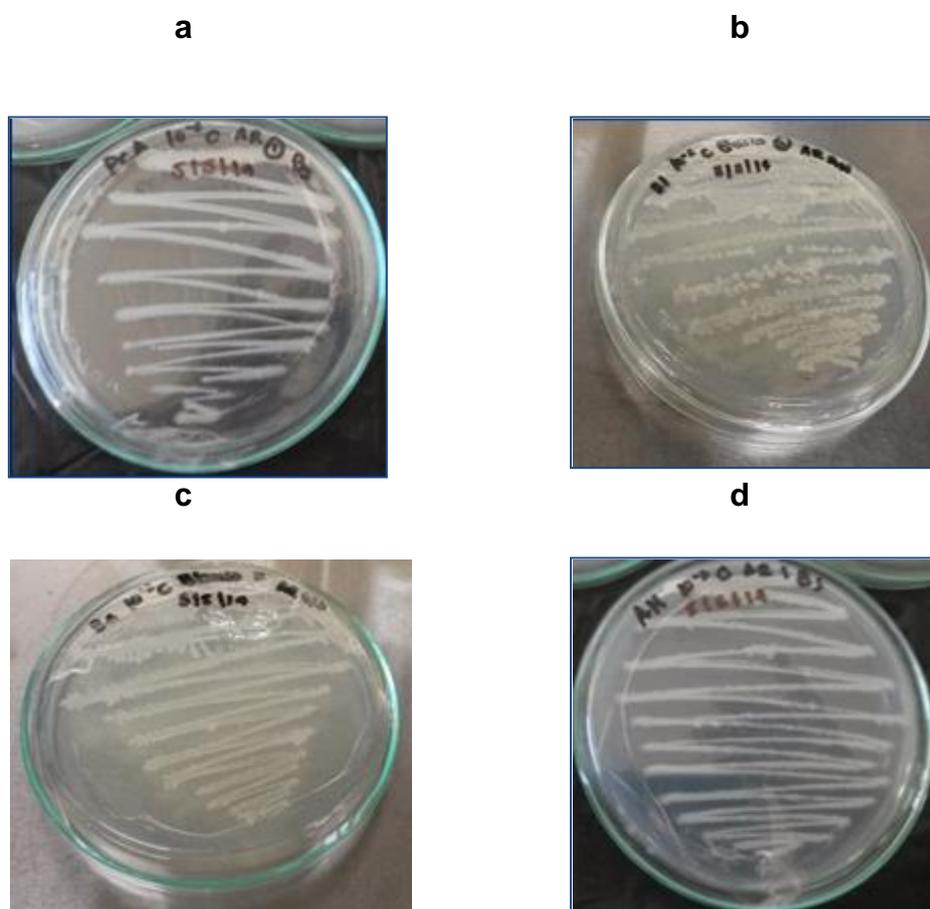


Figura 9: a - Crecimiento en agar de desarrollo (PCA); b - crecimiento en agar nutriente (AN); c - crecimiento homogéneo dilución (10^{-5}); d - crecimiento homogéneo dilución (10^{-6}).

Las colonias seleccionadas de *Bacillus subtilis* se inocularon en un tubo de ensayo con 5ml de solución que contenía 5ml de glucosa al 20% en 95ml de cultivo nutritivo y se cubrió con 1ml de aceite mineral, finalmente se incubó por 48 horas a temperatura ambiente, los tubos fueron observados a contra luz verificando que no exista crecimiento microbiano (Figura 10 a).

Al no existir crecimiento microbiano se realizó el Test de Voges Proskauer que consiste en dos etapas: Cultivo en caldo constituido por Fosfato di hidrógeno de amonio, Fosfato dipotásico, Sulfato de magnesio

heptahidratado, cloruro de sodio, extracto de levadura y glucosa del cual se dispensó 20ml en un tubo de ensayo de 50ml, se esterilizó por 15 minutos a 125°C, luego se inocularon con colonias de 24 horas de cultivo e incubaron a 30°C durante 5 días (Figura 10 b).

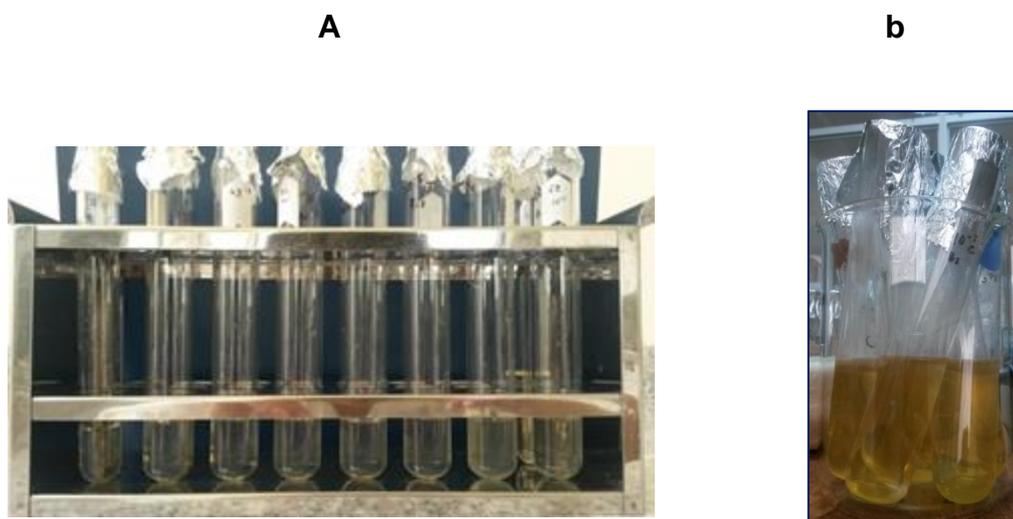


Figura 10: a - Prueba de crecimiento anaeróbico; b - cultivo en caldo Voges Proskauer

Para la realización del test se procedió a homogenizar la muestra y tomar una alícuota de 1ml de cultivo, se añadió 6ml de α - *Naphtol* al 5% en alcohol absoluto, se dio vortex por 5 s, adicionando 0,2ml de solución de *KOH* al 40% en agua destilada y agitando por 5s, subsiguientemente los tubos fueron observados permanentemente si existe cambio de color de amarillo a rojo rubí, considerándose como positivo a dicho cambio (Figura 11).

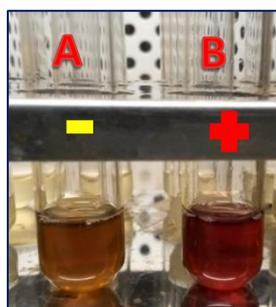


Figura 11: Prueba de Voges Proskauer; A = reacción negativa, B = reacción positiva

Se realizó un frotis de muestra de las colonias aisladas e identificadas anteriormente, humedeciendo con una gota de agua destilada antes de la observación en la foto microscopio marca Carl – Zeiss (Figura 12).



Figura 12: Identificación de la cepa pura de *Bacillus subtilis*.

Con las colonias identificadas y consideradas cepas puras se realizó una siembra en Agar Nutriente con la técnica de estriado, incubando a 37°C durante 24 horas, al observar crecimiento en el agar se tomó un raspado bacteriano para inocular en el matraz erlenmeyer de volumen 250ml con caldo nutriente se colocó en un agitador incubador (marca: New Brunswick Scientific; tipo: Innova 40) a 37°C, 120rpm durante 72 horas (Figura 13).

a



b



Figura 13: a - Siembra en caldo nutriente; b - condiciones de crecimiento.

Cumplido el tiempo de crecimiento bacteriano se tomó una alícuota de cada matraz y se cuantificó con la ayuda de un espectrofotómetro (marca: Thermo; tipo: Genesys) a una longitud de onda de 560nm específico para determinar la concentración de bacterias en mg/ml (Figura 14 a, b), se tomaron los datos de crecimiento y se calculó las UFC de acuerdo a la Escala Mayor McFarland, posteriormente se procedió a tomar alícuotas de 30ml para la inoculación en el sustrato (Figura 14 c, d).

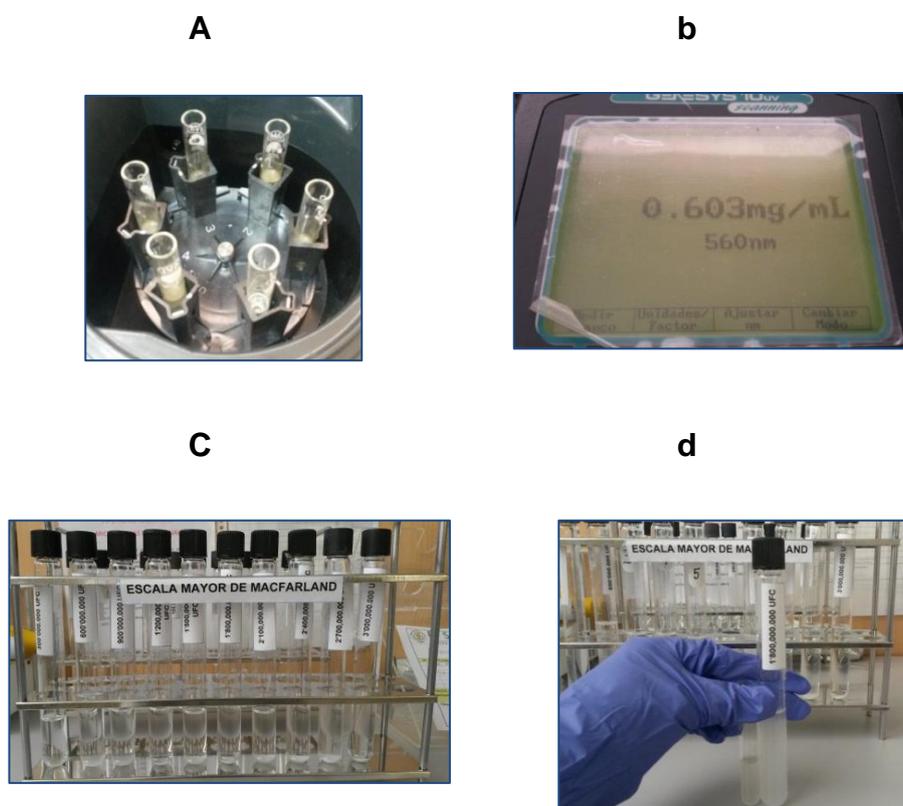


Figura 14: a - Posición de muestras en el espectrofotómetro; b - cuantificación crecimiento microbiano; c - escala Mayor de Mc.Farland; d - Identificación escala.

Se seleccionaron tres cajas de crecimiento bacteriano de *Bacillus subtilis* pura de 24 horas, y se tomó 5 discos de un diámetro de 4cm para colocarlos en un tubo eppendorf de 1ml con glicerol al 25% para la conservación de la bacteria, dicho procedimiento se repitió para los 20 tubos eppendorf, posteriormente se incubo en un ultra refrigerador a -80°C (Figura 15).



Figura 15: Selección de los discos para crio conservación.

2.3. Crecimiento de la bacteria en tres tipos de sustratos

Se evaluó el crecimiento de las bacterias sobre tres tipos de sustratos: cascarilla de arroz, cascarilla de avena (obtenidos de Guayaquil con las siguientes coordenadas 2°12'0"S 79°58'0"O) y Zuro (obtenido en el Cantón El Carmen Provincia de Manabí con las siguientes coordenadas 0°16'0"S 79°26'0"O)

La cascarilla de arroz se trituro en un molino (marca: corona) y se pasó por un colador (tamaño de mesh ≈ 35 ; 0,5 milímetros) para eliminar impurezas. Se tomó una muestra madre de 500g, se autoclavo y se dejó por 30 min en la zona de esterilización (Figura 16 a, b)

La cascarilla de avena, se puso directamente por un colador para la eliminación de espiga, su color amarillo napoles obscuro. Se tomó una muestra madre de 500g, se autoclavó y se dejó por 30 min en la zona de esterilización (Figura 16 c).

El zuro triturado, se tomó una muestra madre de 500g, la cual se autoclavó y se dejó por 30 min en la zona de esterilización (Figura 16 d, e).

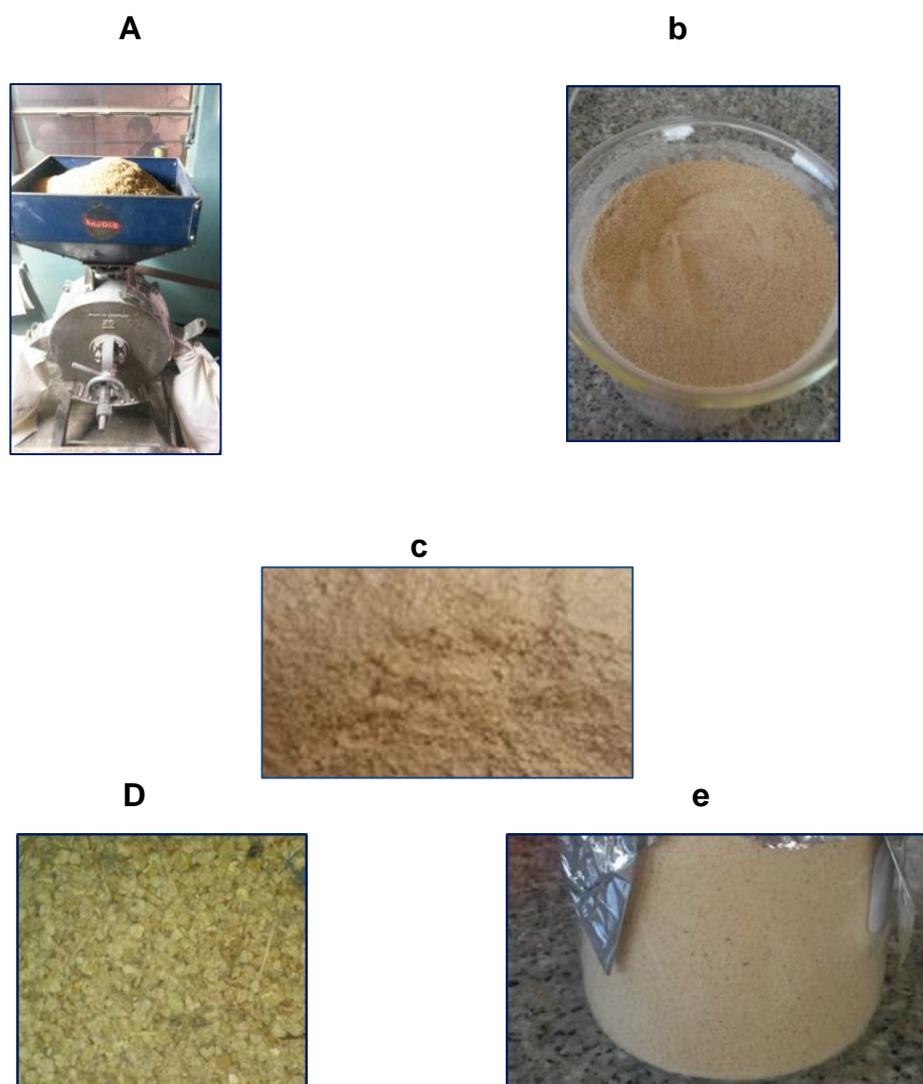


Figura 16: a - molienda de la cascarilla de arroz. b - Muestra madre cascarilla de arroz; c - Cascarilla de avena; d - Zuro de maíz original, e - Zuro de maíz triturado.

Para la preparación de los sustratos, se mezcló 15 g de muestra, 70 ml agua destilada y 30 ml de caldo nutritivo con *Bacillus subtilis*, luego se sellaron con parafilm para homogenizar y colocar en un agitador incubador a 37°C, 120 rpm, durante 6; 8 y 10 días respectivamente.

2.4. Extracción complejo enzimático

A los 6; 8 y 10 días se homogeneizó nuevamente las muestras y se incubaron a 25°C, 250rpm por 2 horas, dejando en reposo aproximadamente 10 min para que precipite y se obtuvo un sobrenadante, el mismo que fue separado con una pipeta para colocarlo en tubos falcon de 15ml y se ultra centrifugó a 4°C, 7,5 gravedades (G), por 10 minutos (Figura 17 a).

Se tomó nuevamente el sobrenadante de cada uno de los complejos enzimáticos a los tres tiempos, se colocaron en papel filtro, dentro de una cámara de flujo laminar (Figura 17 b, c).

Con el volumen obtenido de cada uno de los complejos enzimáticos se tomó muestras con una jeringa de volumen 10ml y se pasó por los filtros de membrana de 0,45 μ m PVDF, luego el producto obtenido se almacenó en balones aforados de 250ml a 4°C (Figura 17 d).

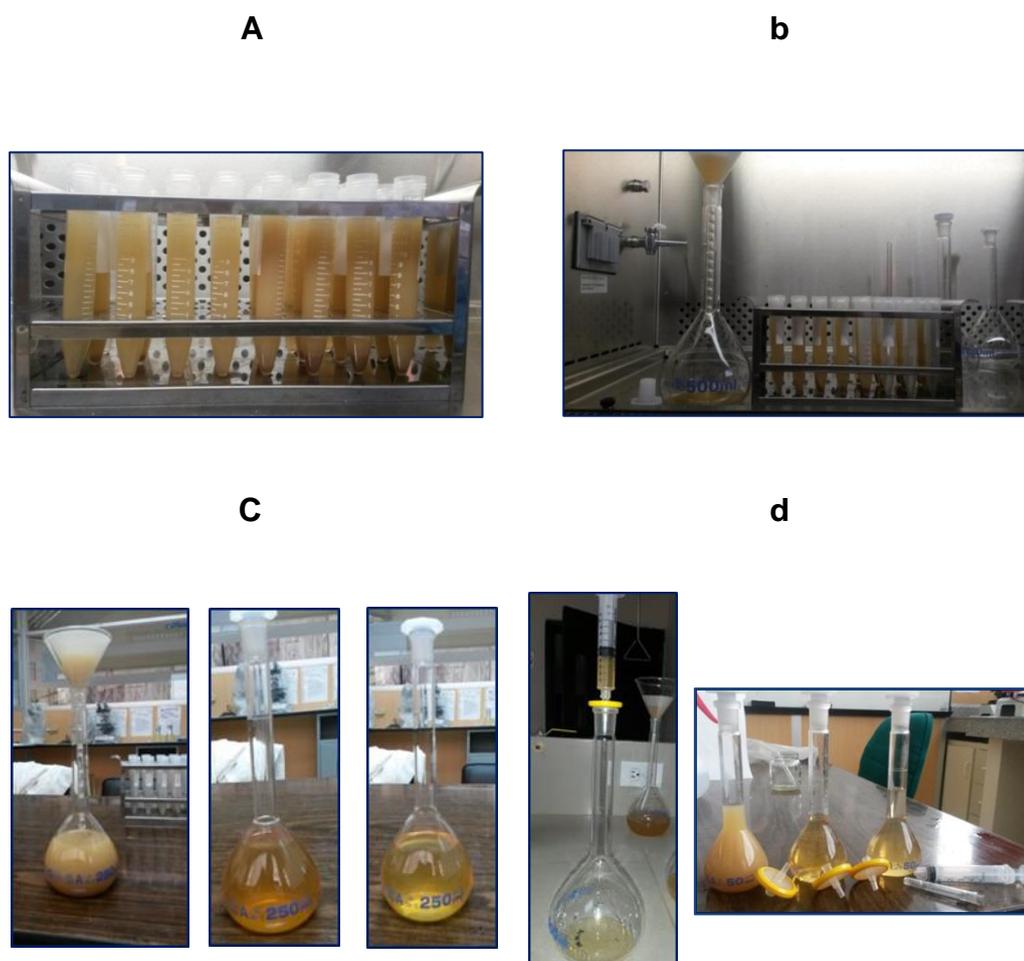


Figura 17: a - Sobrenadante después del homogenizado y ultra centrifugado;
b - Filtración en papel filtro; c - Filtrado de zuro; avena y arroz;
d - Filtración en milipore con filtros de membrana $0,45 \mu m$.

De cada uno de los complejos obtenidos se tomó alícuotas de 15 ml y se realizaron muestras proporcionales de 1 ml en donde se cuantificó la concentración enzimática en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 510nm (Figura 18 a, b).



Figura 18: a - Complejo Enzimático; b - Cuantificación con el espectrofotómetro.

2.5. Purificación enzimática

De cada uno de los extractos enzimáticos obtenidos (Figura 18 a) se tomó $100\mu\text{l}$ en un tubo eppendorf de 5ml, se agregó $100\mu\text{l}$ de $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$; se agitó, luego se centrifugó a 14000rpm durante 10 min, se obtuvo el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo. Luego se seleccionaron muestras por sustrato y se colocaron en cajas Petri selladas para favorecer la formación de cristales de la proteína purificada (Figura 19 b).

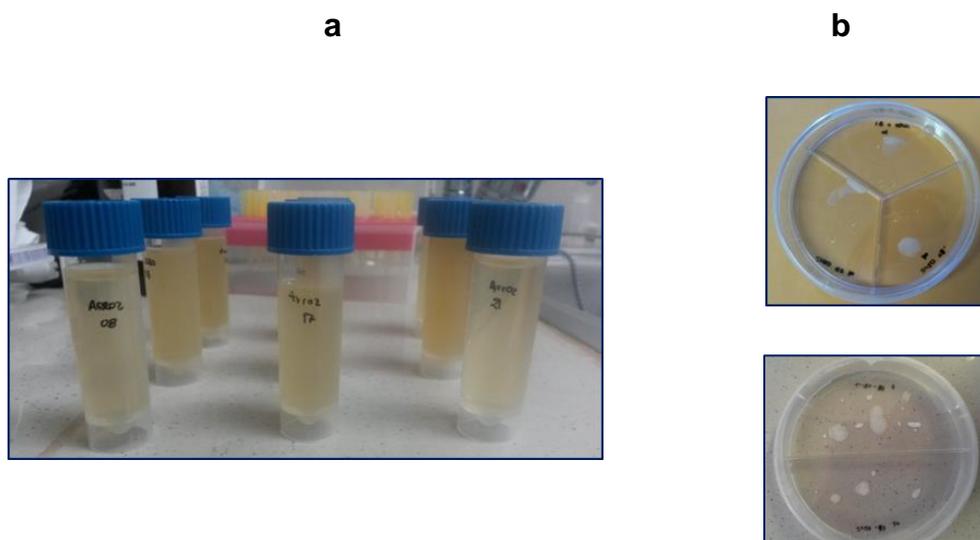


Figura 19: a - Alícuotas de cada uno de los complejos enzimáticos; b - Formación de Cristales.

Con las muestras obtenidas de la purificación con $(NH_4)_2SO_4$, se realizó la electroforesis vertical en gel de poliacrilamida, de la siguiente manera: la preparación de placas consistió en el lavado de los vidrios con solución de hidróxido de Sodio al 1%, se enjuagó con 1L de agua destilada evitando tocar el vidrio, se secó con papel toalla y se limpió con alcohol la superficie, evitando topar con el guante la superficie.

Se preparó la solución adherente ($3\mu L$ de bind silane, $5\mu L$ de ácido acético, $1ml$ de etanol); para colocar y distribuir de forma uniforme en la superficie del vidrio; después en la siguiente placa fue colocada la solución repelente glasscote, posteriormente las dos placas de vidrio fueron ensambladas y colocamos el conjunto de forma vertical, nivelando para la colocación del gel ($19,92ml$ de Acrilamida /Bis y añadir $59,58$ de agua destilada y $20ml$ TBE 1X y $0,7$ PSA y $0,035$ TEMED); se cargó cuidadosamente el gel para evitar la formación de burbujas, consecutivamente colocamos el peine en la parte superior y se dejó polimerizar durante $1,5$ horas.

Una vez que el gel ha polimerizado, se armó la cubeta de electroforesis, y se llenó la cámara inferior con tampón de corrida TBE1X alrededor de 1 litro.

En cada una de las muestras se añadió el buffer de carga, se incubó a $50^\circ C$ por 5 minutos, posteriormente se enfrió bruscamente, en hielo. Se cargó aproximadamente $4\mu l$ en el gel de poliacrilamida. Se realizó la corrida electroforética durante 3 horas a $2000V$. La visualización de los fragmentos de la enzima mediante coloración con nitrato de plata, con las siguientes soluciones: solución de fijación ($900ml$ de agua destilada + $100ml$ de ácido glacial acético), solución de pretratamiento ($990ml$ de agua destilada + 10 ml de ácido nítrico), solución de tinción ($1000ml$ de agua destilada + $1g$ de nitrato de plata, 5 minutos antes de utilizar se añadió $1500\mu l$ de Formaldehído al 37%); solución de revelado ($1000ml$ de agua destilada + $32,4$ g de carbonato de sodio), se conservaron en refrigeración, 5 minutos

antes de utilizar se adicionó $500\mu\text{l}$ de tiosulfato de sodio al 0,01% y $1500\mu\text{l}$ de formaldehido al 37%.

Solucion de parada (900ml de agua destilada + 100ml de acido glacial acético); una vez realizada la electroforesis, se separó las placas cuidadosamente, el gel queda pegado a la placa grande. Se dejo secar el gel en forma vertical (Figura 20).

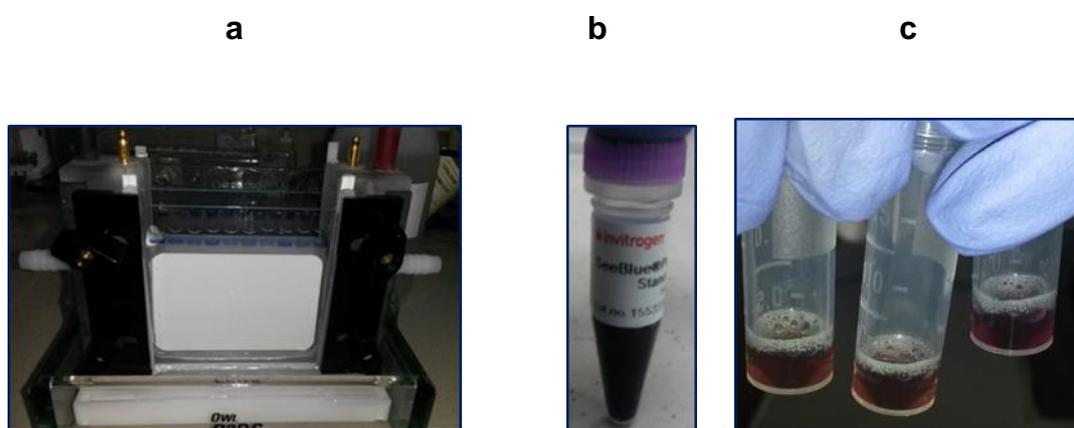


Figura 20: a - Ensamble de electroforesis; b - Marcador molecular; c - Muestras

Para determinar la actividad de la Celulasa, se utilizó el reactivo de Biuret, indicador que reacciona con la presencia de proteínas en una solución, la reacción se basa en la formación de un compuesto color violeta, presentando un máximo de absorción a la longitud de onda de 540nm, considerándole como positiva la reacción en todos los compuestos que tengan dos o más enlaces peptídicos consecutivos en sus molécula (Figura 21).

Las muestras para la elaboración de la curva de calibración fueron preparadas de acuerdo a la tabla 1.

Tabla 1

Preparación curva de calibración

N° TUBOS	Glucosa (mg/ml)	Volumen (ml) Glucosa	Volumen H_2O destilada	Volumen (ml) TCA 0,3M
Blanco	0	0	1,5	2
1	0,1	0,15	1,35	2
2	0,2	0,3	1,2	2
3	0,3	0,38	1,12	2
4	0,5	0,75	0,75	2
5	0,75	1,13	0,37	2

Se adicionó a cada tubo 3,5 ml de Biuret y se hizo hervir por 5 minutos, se dejó enfriar en un recipiente con agua y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510nm.

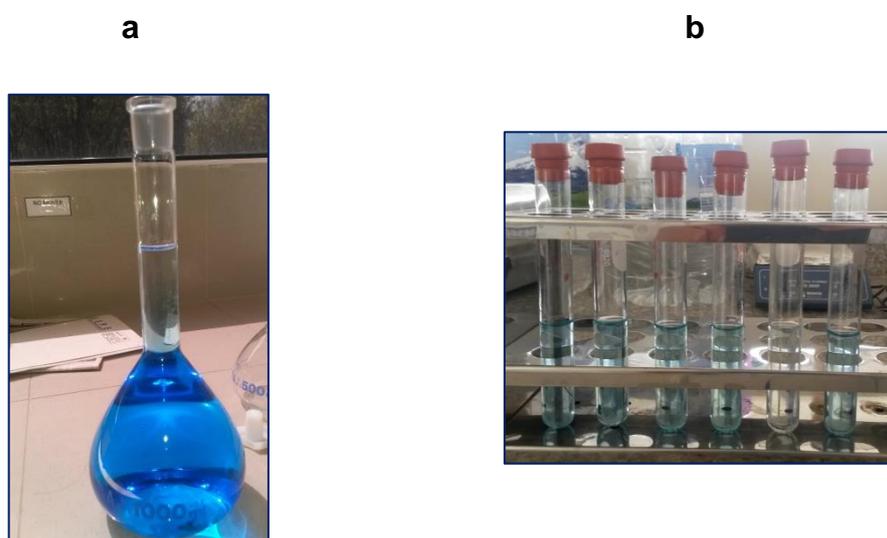


Figura 21: Reactivo Biuret

Para medir la actividad enzimática de la Celulasa, se colocó en un tubo falcón de 15ml, 1ml de solución de sustrato específico (CMC) al 1% p/v en buffer citrato pH=5,4; se añadió 0,5ml de extracto enzimático, se llevó a incubar a 50°C por 10 min, esperando la formación de glucosa; se agregó 2

ml de TCA 0,3 M y 3,5 ml de reactivo Biuret, se hizo hervir por 5 minutos y luego dejamos enfriar en un recipiente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510nm.

Los parámetros cinéticos evaluados ($V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{M}/\text{min}$); K_m (mol/L); K_{cat}), grado de pureza (GP) y la actividad específica (A_e (U/mg)) fueron medidos directamente en el espectrofotómetro; con estos valores se estableció el Modelo enzimático de Michaelis – Mente.

2.6. Análisis de la información

Las variables fueron analizadas con estadística descriptiva (promedio, error estándar y diferentes técnicas gráficas, se realizó un análisis de la varianza para la velocidad del homogenizado y velocidad de purificación, utilizando el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + M_j + H_k + S M_{ij} + S H_{ik} + M H_{jk} + S M H_{ijk} + e_{ijk}$$

En donde:

S_i = efecto del i – ésimo sustrato

M_j = efecto del j – ésimo concentración

H_k = efecto del k – ésimo tiempo

$S M_{ik}$ = efecto de la interacción del sustrato y el tiempo

$M H_{jk}$ = efecto de la interacción de la concentración y el tiempo

$S H_{ik}$ = efecto de la interacción del sustrato y el tiempo

$S M H_{ijk}$ = efecto de la interacción del sustrato, concentración y tiempo

e_{ijk} = error experimental

Se realizaron pruebas de comparación de medias DGC al 5%, para sustratos, concentraciones, tiempos e interacciones. Además se realizaron análisis de regresión lineal entre la velocidad del homogenizado y la concentración CMC, velocidad de purificación y la concentración CMC, sustratos y la concentración CMC, los sustratos y la velocidad del homogenizado, los sustratos y la velocidad de purificado, tiempo y velocidad de homogenizado, tiempo y velocidad de purificado.

A partir de los modelos de regresión significativos se calculó la velocidad máxima ($\mu\text{mol}/\text{min}$) y k_m ($\frac{\text{mol}}{L}$), en base a estas variables se estimó la velocidad inicial ($V_o = \frac{1}{2}V_{m\acute{a}x}$, $\mu\text{mol}/\text{min}$), la actividad específica ($Ae = \frac{U}{mg} = \frac{\mu\text{mol min}^{-1}}{\text{masa total}}$), el k_{cat} ($K_{cat} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{[E_T]}$). Se realizaron gráficas de linealización de Linewaver – Burk y se determinó el K_m y la $V_{m\acute{a}x}$ con los dobles recíprocos ($\frac{1}{V_o} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{k_m}{V_{m\acute{a}x}} * \frac{1}{S_o}$).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. Dilución, Aislamiento, Purificación e Identificación de *Bacillus subtilis*.

Posteriormente de las diluciones, aislamientos y la utilización del medio específico con púrpura de bromocresol se sembraron 70 cajas donde se obtuvo las siguientes cepas: *Bacillus subtilis* de suelo de cultivo de chocho en un 55,71% (Figura 22 a-b), *Pseudomona fluorescens* de suelo de invernadero en un 25,7% (Figura 22c), *Pseudomona putida* de suelo de potrero en un 11,43% (Figura 22 d); con un rango de contaminación de 7,14%.

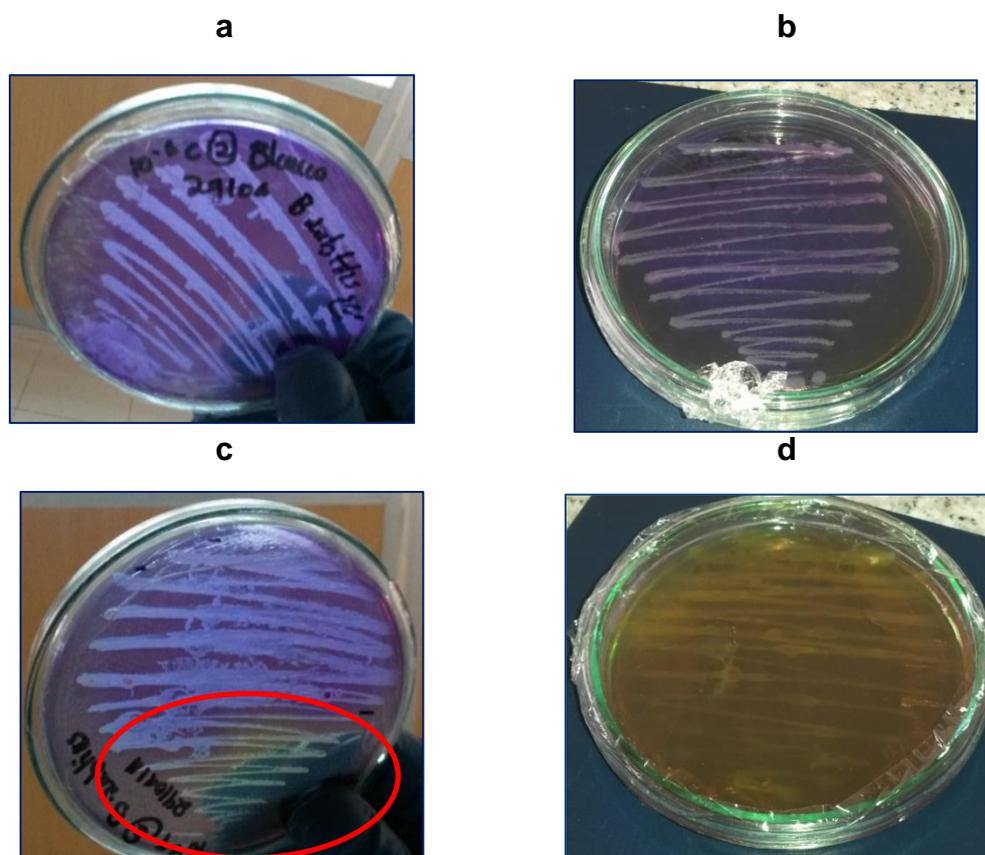


Figura 22: a-b - Cepa pura de *Bacillus subtilis*, c - *Pseudomona fluorescens*, d - *Pseudomona putida*.

A partir de las colonias aisladas de *Bacillus subtilis* se realizó las pruebas de identificación, las cuales se basaron en el crecimiento anaeróbico en caldo de glucosa, dando un resultado negativo (Figura 23 a); posteriormente se realizó el test de Voges Proskauer que dio positivo (Figura b).

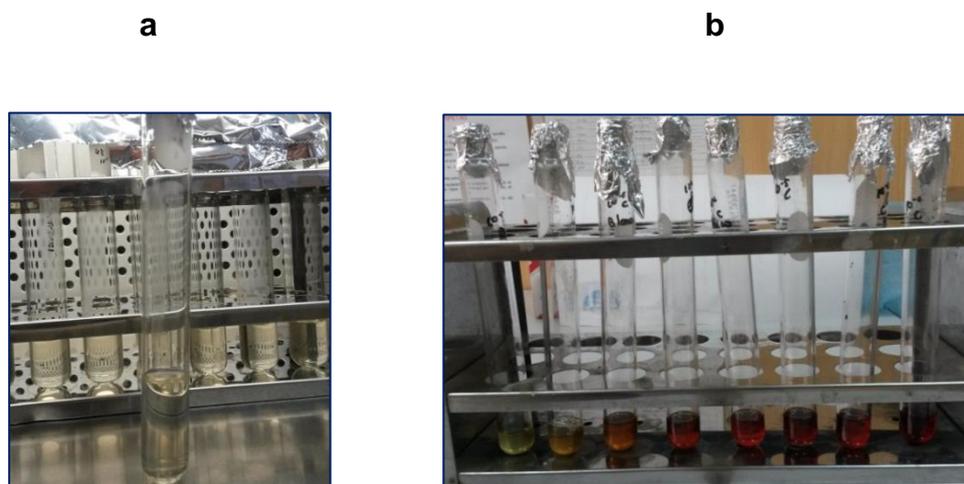


Figura 23: a - Crecimiento anaeróbico negativo para *Bacillus subtilis*;
b - Test de voges proskauer positivo para *Bacillus subtilis*.

Una vez identificadas las colonias, se procedió a cuantificar la concentración bacteriana en el espectrofotómetro a una longitud de onda 560nm, los resultados obtenidos se compararon con la escala mayor McFarland que nos da unidades formadoras de colonia (UFC), de acuerdo a la siguiente tabla N° 2, dando un promedio de $0,5124 \text{ mg/ml}$ y $15 \cdot 10^8$ UFC para la inoculación en los sustratos.

$$UFC = \frac{x * 3 * 10^8}{1}$$

Ecuación 2 Transformación a UFC

Tabla 2

Cuantificación de Bacillus subtilis.

Concentración ($\frac{mg}{ml}$)	Escala de Mc Farland (UFC)	
0,18	1	300000000
0,205	2	600000000
0,225	2	600000000
0,513	5	1500000000
0,529	5	1500000000
0,589	5	1500000000
0,604	6	1800000000
0,701	7	2100000000
0,753	7	2100000000
0,825	8	2400000000
0,5124	5	1500000000

Para la cuantificación enzimática se realizó la curva de calibración a diferentes concentraciones de glucosa tomando las medidas en el espectrofotómetro (marca: Thermo; tipo: Genesys) del laboratorio de Biotecnología (Tabla 3 y Figura 24).

Tabla 3

Absorbancias de la curva de calibración

N° TUBOS	Glucosa (%)	Cuantificación (mg/ml)	
Blanco		0	0,000
1		0,1	0,032
2		0,2	0,036
3		0,3	0,040
4		0,5	0,049
5		0,75	0,059

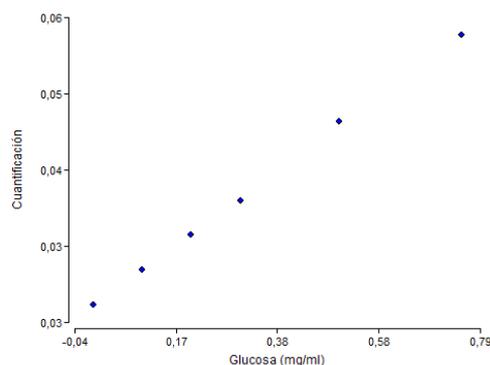


Figura 24: Curva de calibración.

3.2. Crecimiento de *Bacillus subtilis* en los sustratos de estudio.

El objetivo de la investigación fue estudiar la cinética de la Celulasa; es conocido que los microorganismos (Bacterias u Hongos) secretan enzimas de acuerdo al sustrato sobre el cual actúan.

Se consideró los sustratos (cascarilla de arroz, cascarilla de avena y zuro) para tratarlos con *Bacillus subtilis* obtiene alta cantidad de Celulasa con la finalidad que en el extracto enzimático exista un predominio de Celulasa.

Se obtuvo un volumen de 250ml de cada tratamiento.

Sustratos	Color	Olor
Zuro	Amarillo pajizo	Fermentado alto
Cascarilla de avena	Amarillo dorado	Fermentado medio
Cascarilla de arroz	Ambar	Fermentado bajo

3.3. Evaluación de la actividad enzimática

Para la evaluación de la Celulasa se eligió un sustrato específico que tenga enlaces glucosídicos $\beta - 1,4$, el sustrato elegido fue CMC; cuyo pH, Fuerza iónica y T° constante, para lo cual se utilizó el tampón citrato.

De la solución de CMC a diferente concentración se tomó 1ml y se mezcló con 1ml del extracto enzimático obtenido de cada uno de los sustratos en estudio del crecimiento de la bacteria Tabla 4,5y 6; por sustrato.

Tabla 4

Zuro

Tiempo (días)	Solución Tampón +CMC (%)	Volumen de extracto enzimático (ml)	Velocidad Homegenado (mg/ml/ min)	Velocidad purificado con $(NH_4)_2SO_4$ (mg/ml/min)
6	0,5	1	12,01	12,29
	1	1	12,21	59,92
	1,5	1	12,64	36,38
8	0,5	1	11,04	27,32
	1	1	9,82	69,92
	1,5	1	10,32	20,47
10	0,5	1	13,81	8,56
	1	1	13,50	35,75
	1,5	1	12,35	17,35

Tabla 5

Cascarilla de Avena

Tiempo (días)	Solución Tampón +CMC (%)	Volumen de extracto enzimático (ml)	Velocidad Homegenado (mg/ml/ min)	Velocidad purificado con $(NH_4)_2SO_4$ (mg/ml/min)
6	0,5	1	7,76	8,126
	1	1	7,546	32,38
	1,5	1	7,035	23,678
8	0,5	1	7,226	8,100
	1	1	7,33	32,22
	1,5	1	7,1213	17,154
10	0,5	1	6,842	3,39
	1	1	7,6473	41,85
	1,5	1	7,834	26,26

Tabla 6

Cascarilla de Arroz

Tiempo (días)	Solución Tampón +CMC (%)	Volumen de extracto enzimático (ml)	Velocidad Homegenado (mg/ml /min)	Velocidad purificado con $(NH_4)_2SO_4$ (mg/ml/min)
6	0,5	1	5,3667	6,33
	1	1	5,2884	31,99
	1,5	1	5,34	23,99
8	0,5	1	5,039	4,5315
	1	1	5,5871	43,39
	1,5	1	5,02	21,545
10	0,5	1	3,9116	5,873
	1	1	4,818	36,771
	1,5	1	4,724	9,77

Posteriormente la información de las tablas anteriores se realizó el tratamiento estadístico en el InfoStat dando como resultado la tabla 7 donde se observan los valores de la velocidad máxima (actividad enzimática) de la Celulasa en los diferentes tratamientos con el sustrato específico CMC; observando en dicho cuadro el máximo valor de la actividad enzimática correspondiente al extracto enzimático extraído del zuro con un valor de $13,81 \text{ mg}/\text{min}$ y $13,5 \text{ mg}/\text{min}$ equivalente en unidades a 57,49 U y 56,20 U; que corresponde a las concentraciones de 0,5% y 1%, de CMC a los 10 días de fermentación del zuro con *Bacillus subtilis*, mientras que en los extractos enzimáticos extraídos del arroz y avena tratados con la bacteria de estudio no se obtuvieron valores representativos lo que conduce aseverar que estos sustratos no producen cantidad significativa de celulasas como se indica en la tabla 7, figura 25. Cabe mencionar que en los de 6 y 8 días de fermentación de los sustratos en estudio y la bacteria, al extraer el extracto enzimático y reaccionar con el sustrato específico se observa un predominio de la actividad enzimática correspondiente al zuro, resaltando que la mayor cantidad de Celulasas se encuentra a los 10 días.

Tabla 7

Absorbancia de la velocidad de reacción

Tiempo	Concentración CMC	Sustrato	Promedio \pm EE
10	0,5	ZURO	13,81 \pm 0,51 a
10	1	ZURO	13,5 \pm 0,51 a
6	1,5	ZURO	12,64 \pm 0,5 b
10	1,5	ZURO	12,36 \pm 0,51 b
6	1	ZURO	12,21 \pm 0,5 b
6	0,5	ZURO	12,02 \pm 0,5 b
8	0,5	ZURO	11,04 \pm 0,48 c
8	1,5	ZURO	10,03 \pm 0,48 d
8	1	ZURO	9,82 \pm 0,48 d
10	1,5	AVENA	7,83 \pm 0,51 e
6	0,5	AVENA	7,76 \pm 0,5 e
10	1	AVENA	7,65 \pm 0,51 e
6	1	AVENA	7,55 \pm 0,5 e
8	1	AVENA	7,33 \pm 0,48 e
8	0,5	AVENA	7,23 \pm 0,48 e
8	1,5	AVENA	7,12 \pm 0,48 e
6	1,5	AVENA	7,04 \pm 0,5 e
10	0,5	AVENA	6,84 \pm 0,51 e
8	1	ARROZ	5,59 \pm 0,48 f
6	0,5	ARROZ	5,37 \pm 0,5 f
6	1,5	ARROZ	5,34 \pm 0,5 f
6	1	ARROZ	5,29 \pm 0,5 f
8	0,5	ARROZ	5,04 \pm 0,48 f
8	1,5	ARROZ	5,02 \pm 0,48 f
10	1	ARROZ	4,82 \pm 0,51 f
10	1,5	ARROZ	4,72 \pm 0,51f
10	0,5	ARROZ	3,91 \pm 0,51 g

Representación gráfica de la concentración de CMC & Velocidad de reacción.

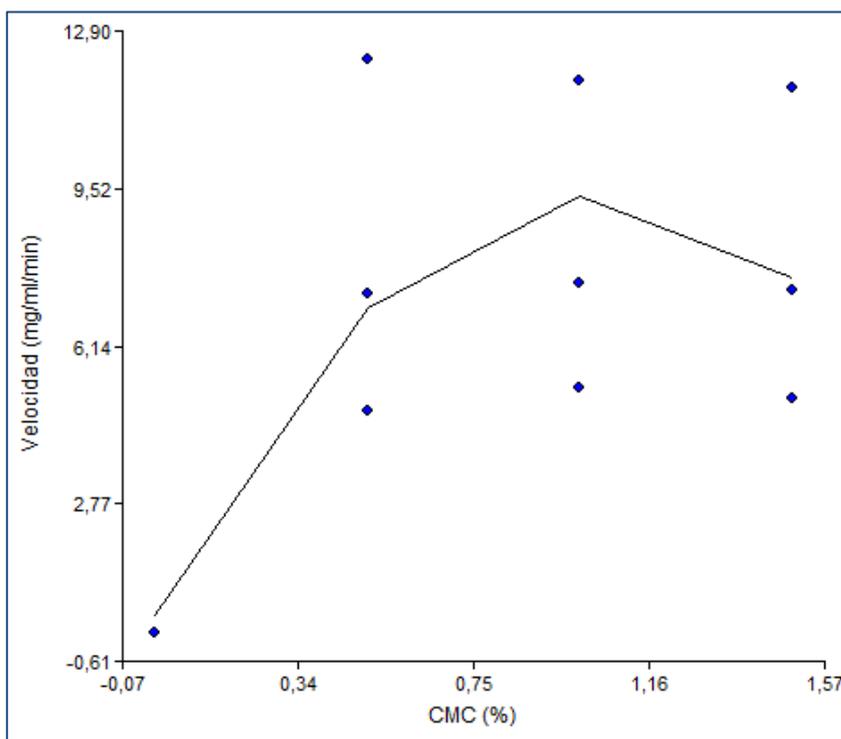


Figura 25: Representación gráfica de la velocidad de reacción para el modelo de Michaelis – Menten.

$$y = 0,39 + 17,27C - 8,30C^2$$

$$R^2 = 0,62$$

$$p = 0,0123$$

Ecuación 3: Ecuación correspondiente al figura 25.

En la figura 25 se evidencia que a la concentración de CMC de 1% se obtiene el $V_{\text{máx}}$ valor que aproximadamente coincide con el resultado analítico del desarrollo de la ecuación que es 1,04%; además se evidencia en el mismo gráfico que si aumentamos la concentración de CMC se nota una disminución de la velocidad de reacción de la que podemos decir que la concentración de sustrato óptimo a 0,5 μl de extracto enzimático es el 1% de CMC.

3.4. Determinación de los parámetros cinéticos

El cálculo de los parámetros cinéticos correspondientes a la enzima y al sustrato se realizó mediante dos métodos, el uno de la resolución analítica de la ecuación y el otro utilizando el modelo matemático de linealización de los dobles recíprocos de Linewaver – Burk.

Las constantes correspondientes a la enzima son: velocidad máxima, actividad enzimática, constante catalítica, actividad específica y grado de pureza; la constante de Michaelis (K_m) es específico del sustrato o también conocido como constante de especificidad.

a. Resolución analítica de la ecuación de la figura 25 para la enzima

$$V_{m\acute{a}x} = 9,37 \text{ mg}/\text{min} = 39,01 U$$

$$U = \mu\text{mol}/\text{min}$$

$$Ae = \frac{U}{\text{mg}}$$

masa total

$$x = 4,92 \text{ mg} * \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 4,92 * 10^{-3} \text{ g}$$

$$PM = 44,2 \text{ kDa} = 44200 \text{ g/mol}$$

*Valor obtenido de la cromatografía con el marcador molecular SeeBlue.

$$Ae = \frac{\text{Actividad enzimática (U)}}{\text{masa total de la proteína (mg)}}$$

$$Ae = \frac{390,01 U}{4,92 \text{ mg}}$$

$$Ae = 79,27 \text{ U/mg}$$

Para encontrar la K_{cat} de esta enzima se determinó el peso molecular mediante el método de cromatografía vertical y el marcador molecular see blue, obteniendo un valor de 44,2 kDa (figura 26), valor promedio de trabajo experimental en el laboratorio de docencia Biotecnología que comparado con datos bibliográficos del peso molecular de la Celulasa son aproximadamente similares (45 kDa).

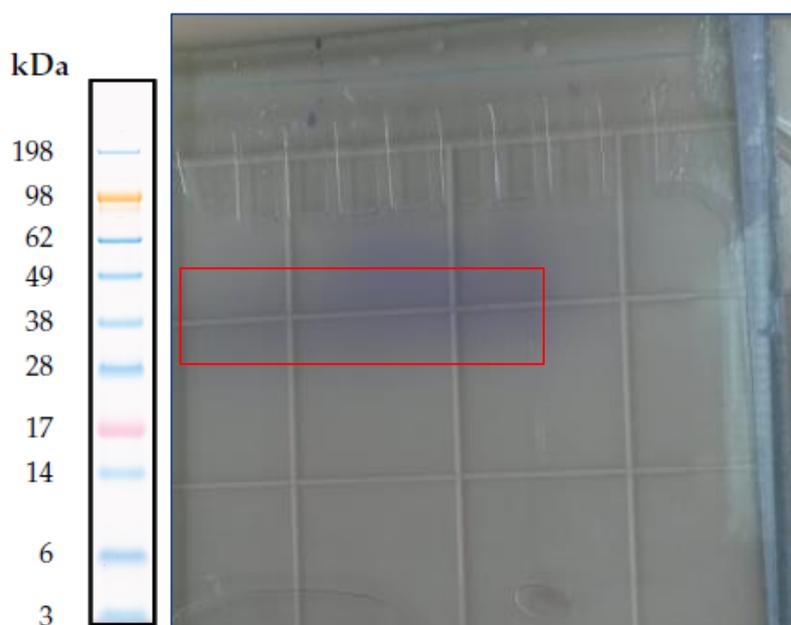


Figura 26: Identificación de la Celulasa en gel de poliacrilamida SDS – PAGE, en base al marcador molecular SeeBlue.

$$K_{cat} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{[E_T]}$$

$$K_{cat} = \frac{39,01 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}}{1,11 * 10^{-1} \mu\text{mol}} = 351,44 \text{ min}^{-1}$$

$$GP = 1$$

Concentración de sustrato para la máxima velocidad

$$y = 17,27 - 2(8,30)C$$

$$0 = 17,27 - 16,60C$$

$$C = \frac{17,27}{16,60}$$

$$C = 1,04 \text{ mg/ml}$$

La concentración 1,04 mg es la cantidad de sustrato óptimo para tener la velocidad máxima de 39,01 U, valor que coincide con la figura 25.

Constante de Michaelis correspondiente al sustrato (CMC)

$$4,68 = 0,39 + 17,27C - 8,30C^2$$

$$K_m = 0,00028M$$

Modelo Matemático de Linealización

El modelo de Lineweaver – Burk es el doble recíproco de la ecuación de Michaelis y Menten $(\frac{1}{V_o} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{km}{V_{m\acute{a}x}} * \frac{1}{S_o})$. este modelo representa a la ecuación lineal $y = a + bx$ (de la recta).

$$y = \frac{1}{V_o}$$

$$a = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

$$b = \frac{km}{V_{m\acute{a}x}}$$

$$x = \frac{1}{S_0}$$

Tabla 8

Dobles recíprocos de la velocidad de reacción.

X	Y
0	0,08741259
0,5	0,09973776
1	0,11206294
1,5	0,12438811

Representación gráfica de $\frac{1}{S}$ & $\frac{1}{v_0}$

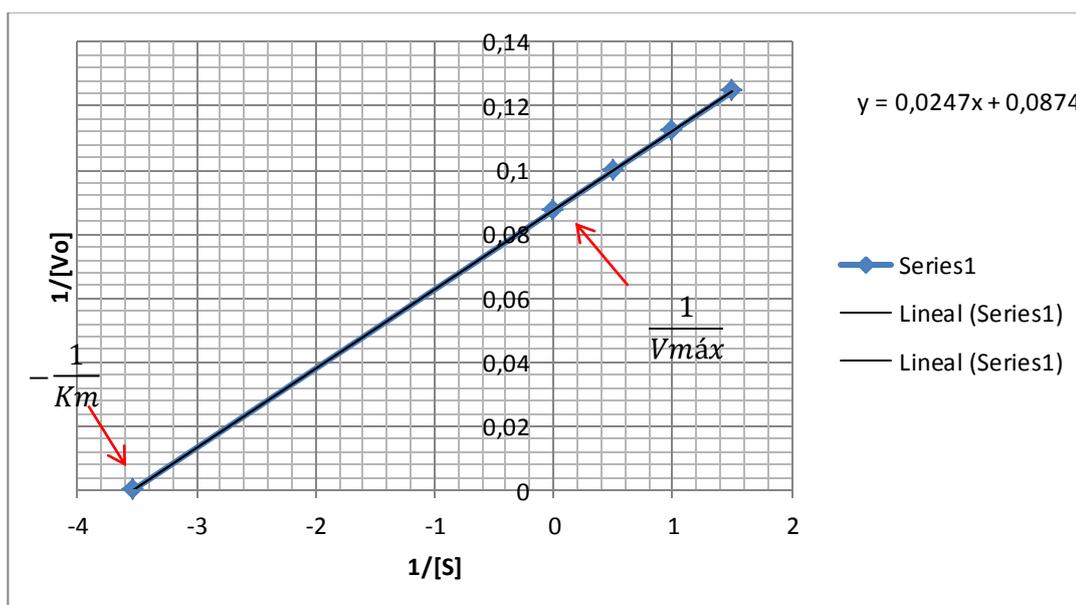


Figura 27: Representación gráfica de linealización Lineweaver- Burk.

Comprobación del valor de k_m

$$y = 0,0247x + 0,0874$$

$$k_m = 11,49 * 0,0247$$

$$k_m = 0,28 \text{ mg}$$

$$k_m = 0,000275 \text{ M}$$

Por medio del gráfico de linealización (Figura 27) se obtiene el valor de K_m el mismo que es comprobado con la resolución de la ecuación.

Etapa de purificación con $(NH_4)_2SO_4$.

Subsiguientemente la información de la tabla 9 donde se observan los valores de la velocidad máxima luego de la etapa de purificación de la enzima con $(NH_4)_2SO_4$ al 50% y reaccionando con el sustrato específico (CMC), observando en dicho cuadro el máximo valor de la actividad enzimática correspondiente al extracto enzimático extraído del zuro con un valor de $69,96 \text{ mg}/\text{min}$ equivalente en unidades a 291,26 U; que corresponde a la concentración de 1% de CMC a los 8 días de fermentación con *Bacillus subtilis*.

Tabla 9

Absorbancia de la velocidad de reacción purificada.

Tiempo	Concentración CMC	Sustrato	Promedio + EE
8	1	ZURO	69,96 ± 2,9 a
6	1	ZURO	59,92 ± 2,68 b
8	1	ARROZ	43,39 ± 2,9 c
10	1	AVENA	41,85 ± 2,35 c
10	1	ARROZ	36,77 ± 2,35 d
6	1,5	ZURO	36,38 ± 2,68 d
10	1	ZURO	35,75 ± 2,35 d
6	1	AVENA	32,39 ± 2,68 d
8	1	AVENA	32,21 ± 2,9 d
6	1	ARROZ	31,99 ± 2,68 d
8	0,5	ZURO	27,32 ± 2,9 e
10	1,5	AVENA	26,26 ± 2,35 e
6	1,5	ARROZ	24 ± 2,68 e
6	1,5	AVENA	23,68 ± 2,68 e
8	1,5	ARROZ	21,55 ± 2,9 e
8	1,5	ZURO	20,47 ± 2,9 e
10	1,5	ZURO	17,36 ± 2,35 e
8	1,5	AVENA	17,15 ± 2,9 e
6	0,5	ZURO	12,29 ± 2,68 f
10	1,5	ARROZ	9,77 ± 2,35 f
10	0,5	ZURO	8,56 ± 2,35 f
6	0,5	AVENA	8,13 ± 2,68 f
8	0,5	AVENA	8,1 ± 2,9 f
6	0,5	ARROZ	6,33 ± 2,68 f
10	0,5	ARROZ	5,87 ± 2,35 f b
8	0,5	ARROZ	4,53 ± 2,9 f
10	0,5	AVENA	3,4 ± 2,35 f

Representación gráfica de la concentración de CMC & Velocidad de reacción de purificación.

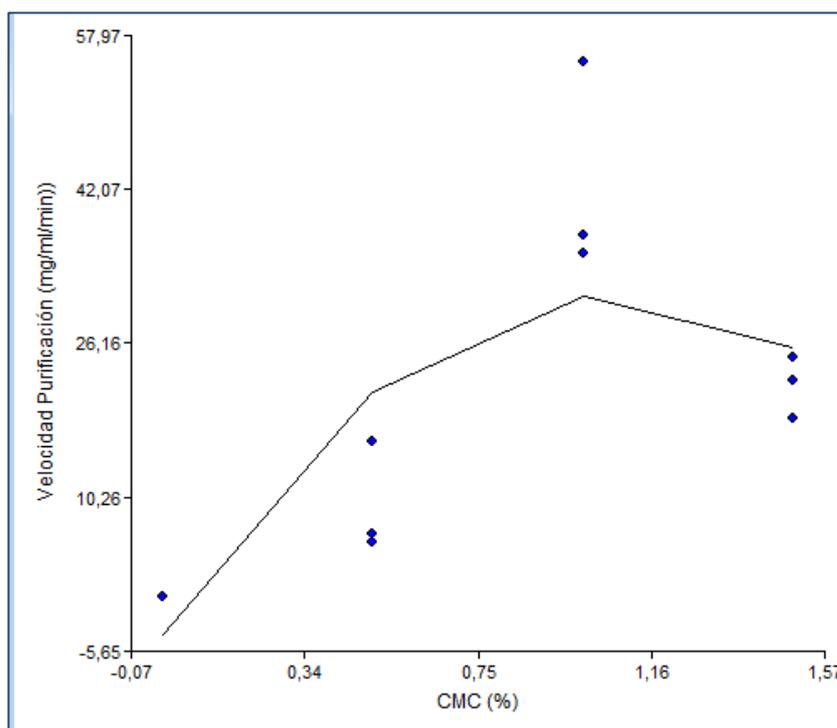


Figura 28: Representación gráfica de la velocidad de reacción para el modelo de Michaelis – Menten

$$y = -3.90 + 65.13C - 30.24C^2$$

$$R^2 = 0,63$$

$$p = 0,0108$$

Ecuación 4: Ecuación correspondiente al figura 29.

En la figura 28 se evidencia que a la concentración de CMC de 1% se obtiene el $V_{m\acute{a}x}$ valor que aproximadamente coincide con el resultado analítico del desarrollo de la ecuación que es 1,07%; además se evidencia en el mismo gráfico que si aumentamos la concentración de CMC se nota una disminución de la velocidad de reacción de la que podemos decir que la concentración de sustrato óptimo a 0,5 μ l de extracto enzimático es el 1%.

3.5. Determinación de los parámetros cinéticos

El cálculo de los parámetros cinéticos correspondientes a la enzima y al sustrato se realizó de manera similar al extracto enzimático sin purificar.

a. Resolución analítica de la ecuación de la figura 27 para la enzima.

$$V_{m\acute{a}x} = 129,77 U$$

$$\frac{Act}{1ml} = \frac{129,77 \mu mol / min}{0,1ml}$$

$$Act = 1297,7 \mu mol * min^{-1} ml^{-1}$$

$$Ae = \frac{U}{mg}$$

$$Ae = \frac{1297,7 U ml^{-1}}{4,92 mg}$$

$$Ae = 263,75 U / mg$$

$$Kcat = \frac{Vm\acute{a}x}{[E_T]}$$

$$Kcat = \frac{129,77 \mu mol / min}{1,09 * 10^{-1} \mu mol} = 1165,79 min^{-1}$$

$$GP = 3,326$$

Constante del sustrato (CMC)

$$30,24C^2 - 65,13C + 19,48$$

$$km = 0,00035M$$

Los valores obtenidos utilizando la misma metodología son:

$$Y = 65,13 - 60,48C$$

$$0 = 65,13 - 60,48C$$

$$C = \frac{65,13}{60,48}$$

$$C = 1,0768 \text{ mg}$$

La concentración 1,076 mg es la cantidad de sustrato óptimo para tener la velocidad máxima de 129,77 U.

Modelo Matemático de Linealización

Se aplica el modelo de linealización anteriormente utilizado.

Tabla 10

Dobles recíprocos de la velocidad de reacción purificada

X	Y
0	0,00770594
0,5	0,00905448
1	0,01040302
1,5	0,01175156

Representación gráfica de $\frac{1}{V_o}$ & $\frac{1}{S}$

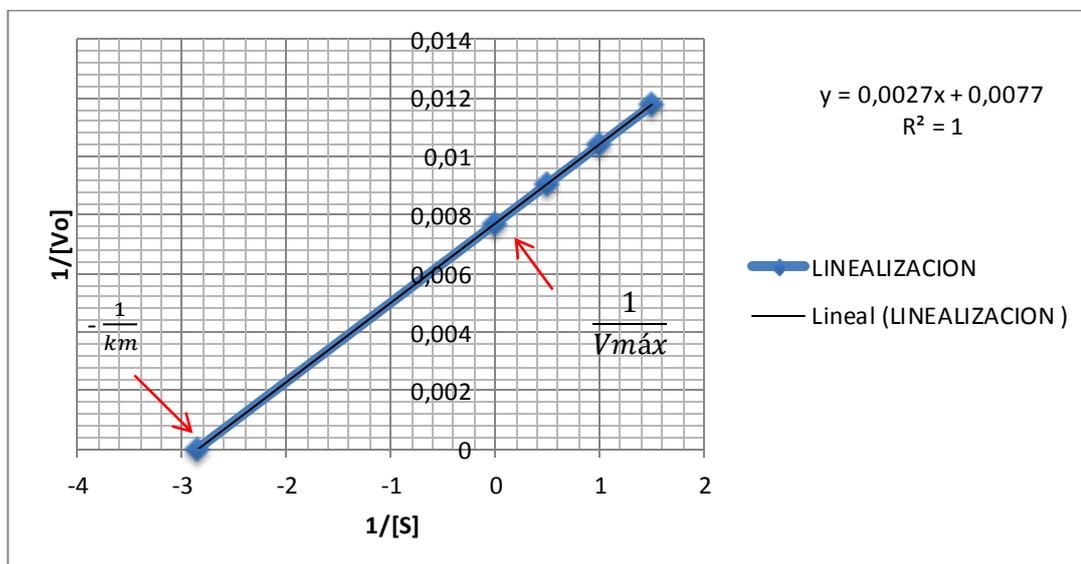


Figura 29: Representación gráfica de linealización Lineweaver – Burk.

Comprobación del valor de km

$$y = 0,027x + 0,0077$$

$$km = 37,03 * 0,027$$

$$km = 0,28 \text{ mg}$$

$$km = 0,00028 \text{ M}$$

Por medio del gráfico de linealización se obtiene el valor de Km el mismo que es comprobado con la resolución de la ecuación.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

Las especies aisladas e identificadas en este estudio, en muestras de suelo de diferentes cultivos fueron *Pseudomona fluorescens*, *Pseudomona putida* y *Bacillus subtilis*; siendo esta última la de mayor predominó en un 55.71% obtenido en el cultivo de chocho, con respecto a las cepas anteriormente mencionadas.

El principal factor en la morfología de la bacteria es el nutriente, determinando de esta manera el tipo de crecimiento y las características de cada una de las cepas (Austin & Priest, 1992); es así que, al utilizar el medio selectivo (púrpura de bromo cresol) para *Bacillus subtilis* se obtuvo un crecimiento homogéneo de color blanquecino; la cual posee una forma planoconvexa, rizoide, lobulada. Para la selección del género bacteriano se utilizó la prueba de crecimiento anaerobio y el test de Voges Proskauer, en base a estos resultados se corroboró la presencia de la cepa pura; la misma que posee la capacidad de secretar Celulasas, resultado que fue comprobado en el laboratorio con el sustrato específico (CMC) que tiene enlaces glucosídicos β 1-4 D-glucosa.

Con el fin de obtener Celulasas se procedió al crecimiento de *Bacillus subtilis* en los sustratos de estudio (cascarilla de arroz, cascarilla de avena y zuro), durante 6; 8 y 10 días de fermentación, para la obtención de extractos enzimáticos los mismos que reaccionaron con el sustrato específico (CMC) a diferentes concentraciones obteniendo los siguientes resultados; tablas 7 y 9.

Tabla 11:

Resumen de la purificación de Celulasa con sulfato de amonio $(NH_4)_2 SO_4$.

Extracto Enzimático	CMC %	Velocidad del Homogenizado (U)	Velocidad de Purificado con $(NH_4)_2 SO_4$ (U)
Zuro – 10 días de crecimiento	1	56,20	148,83
Avena – 10 días de crecimiento	1,5	32,60	109,33
Arroz – 8 días de crecimiento	1	23,27	180,64

La purificación de la enzima Celulasa se resume en la tabla 11. El extracto homogenizado fue precipitado por adición de solución de sulfato de amonio al 50%, el mismo que es útil en la eliminación de proteínas contaminantes, existiendo una mayor velocidad de reacción a 1 % de sustrato específico (CMC), en un periodo de 10 días; mientras que, para el extracto de cascarilla de avena la velocidad de reacción fue a una concentración de 1,5% de CMC en el mismo intervalo de tiempo y, para la cascarilla de arroz fue una concentración de 1 de CMC a los 8 días de fermentación, confirmando una máxima cantidad de enzima purificada en condiciones operativas de pH (6) y temperatura (37°C) lo que maximiza la pureza de la enzima con la consecuente eliminación de otras proteínas.

Tabla 12

Evaluación de los parámetros cinéticos de la Enzima Celulasa ($V_{m\acute{a}x}$; K_{cat} , A_e) sobre el sustrato específico (CMC).

Parámetros	TOTAL HOMOGENADO	TOTAL PURIFICADO	UNIDADES
$V_{m\acute{a}x}$.	39,01	129,77	U
Km	0,00028	0,00035	M
A_e	79,29	263,75	U/mg
K_{cat}	351,44	1165,79	1/min
Grado de Pureza	3,326574173		Adimensional

Por medio de la ecuación cinética de Michaelis – Menten se determinó la cinética del comportamiento del CMC figura 28; el mismo que se asemeja al comportamiento hiperbólico del modelo; además los valores en este diagrama sirvió para determinar los parámetros cinéticos tales como se indica en la tabla 12.

Observando en la misma tabla 12 el aumento significativo de la velocidad de reacción misma que indica el incremento de la cantidad de sustrato CMC consumido o producto formado, por unidad de tiempo. En la etapa de purificación, según Gmein (2014), la velocidad máxima estima el número de centros activos del enzima, siendo la $V_{m\acute{a}x}$ la actividad obtenida, cuando toda la enzima se encuentra unida al sustrato, la misma que depende de la cantidad de enzima.

La actividad enzimática se determinó en el extracto de fermentación semi líquida en los sustratos de estudio, por lo que, se estableció el tiempo óptimo de la mejor interacción bacteria-sustrato, del cual se pudo obtener la máxima actividad observado en la tabla 12, donde se verifica el incremento de las unidades por miligramo de enzima de la preparación al menos en una relación 3:1.

El K_m es característico del sustrato, el cual representa la afinidad de la enzima por el sustrato, según Gmein (2014), cuanto menor sea el K_m mayor es la afinidad de la enzima por el sustrato. En la investigación al tratarse de un mismo sustrato el k_m no varía porque se obtuvo un valor entre ($2,8 \cdot 10^{-3} \text{ M} - 3,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$), recalcando que dicha constante corresponde al sustrato específico (CMC).

Se apreció una mayor significancia estadística al evaluar los parámetros cinéticos en el extracto enzimático purificado del zuro con respecto a los extractos de la cascarilla de arroz y la cascarilla de avena; obteniéndose valores para la Velocidad máx: igual a 129,77 U; Actividad específica: 263,75 U/mg y para la K_{cat} : $1165,79 \text{ min}^{-1}$, lo que nos indica que en el extracto de zuro existe mayor concentración de Celulasa.

El grado de pureza es el número de veces de purificación al que es sometido la enzima, el mismo que fue igual a 1 en la fase inicial antes de la purificación, al concluir la etapa de precipitación con solución de sulfato de amonio al 50% se obtuvo como resultado 3,32, corroborando la pérdida de proteínas contaminantes y generando el incremento de la actividad específica respecto al dato obtenido en la etapa inicial.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

- El extracto enzimático del zuro a una concentración de 0,5% y 1,5 % de carboximetilcelulosa (sustrato específico para Celulasas), presentó la mayor actividad enzimática al décimo día de crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis* en el sustrato (zuro), con valores de 57,49 U y 56,20 U, correspondientemente, por lo que podemos concluir que dicho extracto es rico en Celulasas a ese tiempo de fermentación.
- El extracto enzimático del zuro al octavo día de crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis*; realizado la purificación con solución de sulfato de amonio al 50%, se obtuvo una actividad enzimática de 291,26 U, al tratar con CMC al 1%, por lo tanto se concluyó que la actividad enzimática aumenta con una etapa de purificación; en un rango óptimo de 8 a 10 días.
- El grado de pureza de la enzima, depende directamente de la actividad específica, teniendo un aumento de la misma de 79,29 U/mg del extracto enzimático homogenizado a 263,75 U/mg luego de la etapa de purificación, que equivale a 3,32 veces; por lo tanto se comprueba una vez más importancia de la purificación enzimática.
- Los homogenizados de cascarilla de arroz y cascarilla de avena con el sustrato específico CMC, dieron una actividad de 16,28 U/mg; 14,15 U/mg; esta información al realizar el tratamiento estadístico con el InfoStat se demostró que no son significativos, razón por la cual se consideró los valores de la $V_{m\acute{a}x}$ extraídos del fermento del zuro.
- Existe la factibilidad de descomponer enzimáticamente los residuos agroindustriales ricos en celulosa; que actualmente es fuente de contaminación por falta de un tratamiento biológico para su aprovechamiento.

CAPITULO 6

RECOMENDACIONES

- Se propone el uso de desechos agroindustriales con características económicas accesibles, estables y biodegradables; como nueva fuente de producción de enzimas.
- Realizar ensayos con mezclas proporcionales de cascarilla de avena, cascarilla de arroz y zuro con la bacteria *Bacillus subtilis* y cuantificar la actividad enzimática de la Celulasa y otras enzimas presentes en dichos extractos.
- Evaluar el efecto de otras técnicas de purificación enzimática de la Celulasa, así como también en el aislamiento de la población microbiana.
- Se sugiere a los empresarios de la industria avícola la inclusión de Celulasas en el balanceado, con la finalidad de mejorar la digestibilidad del ave.
- Elaborar un protector y reparador hepático para el ser humano, basado en Celulasas, con la finalidad de proteger al hígado de sustancias tóxicas.
- Estandarizar un protocolo de tratamiento de pulpa de celulosa en la industria papelera, para la reutilización del desecho de producción y la conservación del ambiente.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- Almeida, M. (20 de Junio de 2007). *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*. Obtenido de Universidade Federal do Rio Grande do Sul:
http://www.ufrgs.br/leo/site_espec/
- Aramburu, Z. H. (2011). EXCAVACIÓN DEL TALAYOT DE CASCANAR .
131.
- Arenas, I., & López, J. (1 de Junio de 2004). *Universidad Nacional Autónoma de México*. Obtenido de Instituto de Biotecnología:
http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrometria_de_absorcion.pdf
- ArgenBio. (1 de 01 de 2007). *Programa educativo de ArgenBio*. Recuperado el 1 de 12 de 2014, de Programa educativo de ArgenBio:
<http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=102>
- Armas, F., & Yandum, J. (1998). Uso de Probioticos para la alimentacion de terneros Holstein mestizos alta cruza con leche entera y lactoreemplazante . *Carrera de Ciencias Agropecuarias IASA I*, 14-35.
- Artigos, C. d. (15 de 05 de 2012). *E- Centro*. Recuperado el 8 de 23 de 2014, de E- Centro: http://centrodeartigo.com/articulos-de-todos-los-temas/article_32708.html
- Austin, B., & Priest, F. (1992). *Taxonomia bacteriana moderna* . Mexico: Limusa.
- Basaure, P. (2008). Fotometria de llama. *ICP - AES*, 1.
- Beg, B., & Kapoor, H. (2000). Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. *Ind Microbiol Biotechnol*, 396–402.
- Carrillo, A. (2013). Consumo y consecuencias de comida chatarra en los adolescentes. *ECOS desde las fronteras del conocimiento*, 56-76.
- Darwin, C. (2013). Olote de Maiz . *Sand- Blast*, 2.

- De Castro, N. (05 de 2010). *SCRIBD*. Recuperado el 7 de 12 de 2013, de CITOLOGIA MICROBIANA:
<http://es.scribd.com/doc/31345785/Bacillus-Subtilis-PDF>
- EMBL, E. (2009). Bacilos. *EMBL*, 13.
- Espinosa, J. (Febrero de 2005). *Instituto de Biotecnología*. Recuperado el 13 de 12 de 2013, de Instituto de Biotecnología :
<http://www.ibt.unam.mx/alfredo/JoelEspinosa.pdf>
- FCEN. (3 de 2 de 2010). *Enzimas*. Recuperado el 10 de 12 de 2014, de Enzimas:
<http://www.calvo.qb.fcen.uba.ar/Trabajo%20con%20enzimas.htm>
- Frederic, H., & Reyes, J. (2005). *Moderno e instrumentales Análisis Químico*. Barcelona: Editorial Reverté.
- Gil, A. (2010). *Tratado de Nutricion*. Madrid, España: Medica Panamericana.
- Gmein. (14 de 2 de 2014). *Jmoldesarrollo*. Recuperado el 2 de 11 de 2014, de Jmoldesarrollo: <http://gmein.uib.es/>
- Gonzales & Fragozo. (2002). *Aislamiento y Caracterizacion de B. subtilis*. Bogota.
- INCAP/OPS. (2003). Cereales y sus productos . *CADENA*, 16.
- Jung, R. S. (2013). Recycling rice husks for high-capacity lithium. *PNAS*, 6.
- Kent. (1998). Tecnología de los cereales. *Datateca*.
- Krik, E. (2009). *Microbe of the Week*. Recuperado el 13 de 12 de 2013, de Microbe of the Week:
http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2009/B_subtilis.html
- Lutzen, et al. (1983). Cellulases and their application in Éhe conversion of lignocellulose to fermentable sugar. *Phil. Trans. R. Soc. Lond*, 283.
- Mafla, A. (2009). Uso de la cascarilla de arroz como material alternativo en la construccion . *Ingenieria Civil*.
- Ministerio de Minas y Energia, P. (1990). *Teconologias Limpias*. Recuperado el 22 de 01 de 2014, de ALTERNATIVAS TECNOLÓGICAS DE REUTILIZACIÓN.:
http://www.tecnologiaslimpias.org/html/central/311603/311603_reci.htm
- Núñez De Castro, I. (2001). *Enzimologia*. Madrid: Ediciones Piramide.

- Olsen, E. (1990). *Métodos ópticos de análisis*. Barcelona: Editorial Reverté.
- Pedraza, S. (2012). Obtienen bioetanol a partir del olote. *IBERO Mexico*, 1.
- Primo, E. (2007). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria, Volume 2*. Valencia: Reverté.
- UNAD. (2010). Características de la avena. *Datateca*.
- Valencia, I. (12 de 5 de 2010). *Scribd*. Recuperado el 11 de 8 de 2014, de Scribd: <https://es.scribd.com/doc/57717321/Centrifugacion-clase-7>
- Valverde. (5 de 7 de 2009). *Slideshare*. Recuperado el 7 de 12 de 2013, de Slideshare: <http://es.slideshare.net/segundocorreamoran/cascarilla-de-arroz>
- Van Wijk, J. (2009). Corantes. *Food Ingredients Brasil*, 40-47.
- Villanueva, M., & Dorsal, M. (2008). *INTRODUCCION A LA METROLOGIA QUIMICA*.

SIGLAS Y ABREVIATURAS

CMC	Carboximetilcelulosa
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidad Máxima de reacción
K_m	Constante de Michaelis – Menten
K_{cat}	Número de recambio
<i>Act. esp</i>	Actividad especifica
UI	Unidad Internacional
pH	Potencial hidrógeno
ABS	Absorbancia
RPM	Revoluciones por minuto
g	Gramos
C	Grados centígrados

GLOSARIO

Unidad Internacional de enzima (UI)

Es la cantidad de enzima que, en condiciones óptimas de temperatura, pH y fuerza iónica, es capaz de transformar en sus productos respectivos un micromol de sustrato en un minuto.

Actividad específica

La actividad específica es el número de UI por mg de proteína (sea de enzima pura o de una preparación).

Katal

Se define el katal como la cantidad de enzima que, en condiciones óptimas, es capaz de transformar un mol de sustrato en un segundo.

Número de recambio

K_{cat} o número de recambio es el número de moles de sustrato transformado por mol de enzima en unidad de tiempo.

K_m

La constante de Michaelis, K_m , representa la afinidad de la enzima por el sustrato y es una pseudoconstante de disociación.

Representa aquella concentración de sustrato para la cual la velocidad inicial es la mitad de la velocidad máxima.

V_{max}

Velocidad máxima teórica, es decir es la velocidad cuando todos los centros activos están ocupados con sustrato.

Unidad Formadora de Colonias (UFC)

Expresa el número relativo de microorganismos de un taxón determinado en un volumen de un metro cúbico de agua.

Frotis

Es conocido como extendido, mecanismo científico que consiste en el extendido de una gota de muestra en la superficie de un portaobjetos.

Vortex

Conocido como agitador, es un dispositivo que permite agitar y homogenizar muestras.