

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE
Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Desarrollo tecnológico y generación de riqueza sustentable

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)
DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA LA SUSTENTABILIDAD AMBIENTAL,
ENERGÉTICA Y AIMENTARIA



4D08 DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA LA SUSTENTABILIDAD
AMBIENTAL, ENERGÉTICA Y AIMENTARIA
Regulación metabólica de *Cellulomonas flavigena* PR22 para la producción
de enzimas de interés industrial a partir de residuos agroindustriales.

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes
{Ing. Biotecnología Diego López Salas}

Profesor PAP: PHD Oscar Ariel Rojas Rejón

Tlaquepaque, Jalisco, noviembre de 2018

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP	4
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	4
Resumen	4
1. Introducción.....	5
1.1. Objetivos	5
1.2. Justificación	5
1.3 Antecedentes.....	6
1.4. Contexto	6
2. Desarrollo	7
2.1. Sustento teórico y metodológico	7
2.2. Planeación y seguimiento del proyecto	24
3. Resultados del trabajo profesional.....	29
3.1. Curvas de calibración.....	29
3.2. Caracterización de <i>C. flavigena</i> PR-22	31
3.3. Respuesta de <i>C. flavigena</i> PR-22 a diferentes estímulos metabólicos	34
4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto.....	46
4.1. Aprendizajes profesionales	46
4.2. Aprendizajes sociales.....	47
4.3. Aprendizajes éticos.....	47

4.4. Aprendizajes en lo personal	48
7. Conclusiones.....	48
6. Bibliografía.....	49

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son una modalidad educativa del ITESO en la que el estudiante aplica sus saberes y competencias socio-profesionales para el desarrollo de un proyecto que plantea soluciones a problemas de entornos reales. Su espíritu está dirigido para que el estudiante ejerza su profesión mediante una perspectiva ética y socialmente responsable.

A través de las actividades realizadas en el PAP, se acreditan el servicio social y la opción terminal. Así, en este reporte se documentan las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo del proyecto, sus incidencias en el entorno, y las reflexiones y aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

La biomasa (cualquier producto biológico) representa el recurso de más abundancia en el planeta. Sin embargo, sólo una pequeña fracción de esta se emplea para el consumo y el resto se desecha en procesos de alto impacto ambiental como la quema y su disposición directa en el suelo. El objetivo de este proyecto es reducir estos residuos al transformarlos en productos de alto valor agregado: enzimas de interés industrial. Para esto se contó con diversas fuentes de carbono provenientes de sustratos lignocelulósicos: olote de maíz, rastrojo de maíz hidrolizado a diferentes temperaturas por explosión de vapor, malta gastada y otras que sirven como controles: algodón, CMC y xilana. Estas fuentes de carbono alimentaron a *Cellulomonas flavigena* PR-22, organismo híper productor de xilanasas y productor de celulasas. Esta bacteria fue caracterizada por métodos de tinción y por afinidad al agua corriente y al cloruro de calcio. Para medir la producción de las celulasas en diferentes estímulos metabólicos se emplearon métodos que aprovechan los azúcares residuales del medio después de la hidrólisis (DNS), con celulosa proveniente de distintas fuentes: papel filtro, algodón y CMC. Además, se midieron las proteínas solubles en el medio

por el método de Bradford. Se encontró que la cepa es afín al agua destilada y puede crecer sin cloruro de calcio añadido. Tiene un máximo de producción de celulasas en presencia de xilana, olote y CMC y a una relación carbono/nitrógeno de 1. Su producción de celulasas en biorreactor por lote no difiere mucho del matraz. Sin embargo, su producción de xilanasas es considerable y depende directamente del tipo de sustrato que se utilice, sin importar la relación C/N que se emplee.

1. Introducción

1.1. Objetivos

1.1.1. *Objetivo General*

Encontrar un estado metabólico que maximice la producción de enzimas para su potencial uso en la industria a partir de diferentes residuos agroindustriales.

1.1.2. *Específicos*

- Caracterizar a *C. flavigena* PR-22.
- Mantener una línea celular hípercelulolítica estable genéticamente en el tiempo.
- Establecer y modelar cultivos de producción enzimática en cultivos sumergidos operados por lote y en continuo.
- Identificar y correlacionar el flujo metabólico de CFPR22 con la expresión diferencial de enzimas.

1.2. Justificación

La importancia del proyecto radica en la sustitución de procesos en los que se utiliza materia prima no renovable utilizando la fuente de energía más abundante del planeta, la biomasa. Esta incluye el material biológico proveniente de cualquier organismo (independientemente de si está vivo o no). Una desventaja de esta fuente, sin embargo, es que la producción de biomasa (en la forma de cultivos agrícolas) consume agua y terreno en exceso, generando a su vez una elevada cantidad de residuos de potencial aprovechamiento (Valdez-Vazquez, 2010). Este proyecto busca paliar este problema aprovechando los residuos generados para producir material de alto valor agregado que pueda sustituir al sintetizado a partir de materia prima no renovable y que, además, promueve una economía sustentable al llevar al mínimo el desperdicio de biomasa.

1.3 Antecedentes

En el 2011 las fuentes de energía renovables representaron únicamente el 19% de la demanda energética a nivel mundial, de la cual únicamente el 9.3% provino de la biomasa. En México, sin embargo, el uso de biomasa no ha hecho más que descender pasando de representar el 15.3% de la demanda energética en el país en 1965 a 4.3% en 2010 (García, 2015). Aunado a esto, su uso es principalmente como leña en los hogares de zonas rurales y en la microindustria, repercutiendo en la salud de la población por las emisiones de gases (Alemán-Nava, 2014). Y esto sólo representa una pequeña parte de la biomasa producida en el país, la agricultura genera gran cantidad de biomasa que no se aprovecha en la forma de rastrojos, pajas y restos de poda que comúnmente se eliminan mediante la quema. Esta es, de forma alarmante, la manera predilecta de disponer de los residuos por parte de los agricultores, lo que implica un alto costo medioambiental por las altas emisiones de gases de efecto invernadero, además, representó la causa del 53.65% de los incendios a nivel mundial de 1997 a 2007 (BOE, 2011).

1.4. Contexto

A nivel mundial, se producen 155 billones de toneladas de biomasa al año de la que sólo una pequeña fracción es utilizada para el consumo (Cury, 2017), para dar una idea de este desperdicio, en la industria cervecera sólo se aprovecha 8% de la cebada, en la del aceite, sólo el 9% de los granos, en la del café, el 9.5% y en la del papel, por lo menos 70% de la biomasa son residuos (Saval, 2012). Tan sólo en México, estos residuos ascendieron a 92.23 millones de toneladas en 2006, al ser el tercer lugar en América Latina y el Caribe en cuanto a área empleada para cultivo. De los cuales 75.73 representaron residuos primarios (restantes en los campos después de la cosecha) y 16.5, residuos secundarios (resultado de los procesos posteriores a la cosecha) (Valdez-Vazquez, 2010).

Para solventar esta situación nace el concepto de las biorrefinerías, que buscan convertir biomasa en diferentes productos o energía. Por ejemplo, para la producción de biocombustibles, utilizando residuos lignocelulósicos (García-Arellano, 2014). Actualmente en México existen 4 biorrefinerías: Alcoholera de Zapopan, Destiladora de Papaloapan/

Fabricación de Alimentos Tenerife, Soluciones en Ingeniería Naval, Marina y Terrestre y Bioenergéticos Mexicanos que producen en total 1,417,755 L de bioetanol al año, sin embargo, dejan descuidadas otras áreas que pueden tener retribuciones más pronto como la producción de enzimas e incluso otros energéticos como el biogás (Martínez-Hernández, 2017).

2. Desarrollo

2.1. Sustento teórico y metodológico

2.1.1. Material Lignocelulósico

Forma parte de la biomasa y es, de hecho, todo lo que no se aprovecha de la industria agrícola. Esto lo vuelve la fuente de materia orgánica más abundante en el mundo, además de estar presente en cualquier parte del planeta. Por este motivo ha ganado importancia en los tiempos recientes, se convierte en una fuente de recursos barata y disponible (Hahn-Hagerdal, 2006). Se constituye de tejidos vegetales en tres capas, la interna está conformada de arreglos de celulosa, la capa intermedia está compuesta de hemicelulosa y la capa exterior se compone de lignina, las capas interna y media conforman lo que se conoce como holocelulosa y representan entre el 60 y 80% del peso molecular de los vegetales (Barroso-Casillas, 2010).

2.1.1.1. Composición

2.1.1.1.1. Celulosa

Es un polímero de glucosa formado por enlaces glucosídicos β -1,4. Su unidad mínima es conocida como celobiosa que, a su vez se compone de glucosa (Figura 1). Su ordenamiento es muy comprimido, formando cristales, que le dan gran capacidad de resistencia al exterior (Cajo-Guerrero, 2017).

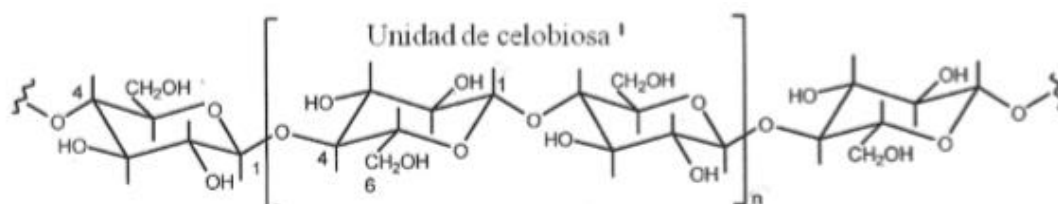


Figura 1. Estructura química de la celulosa y la celobiosa (Barroso-Casillas, 2010).

2.1.1.1.2. Hemicelulosa

A diferencia de la celulosa, que es un homopolímero, la hemicelulosa es un heteropolisacárido, formado por tres pentosas (xilosa, ramnosa y arabinosa), dos hexosas (glucosa, manosa y galactosa) y dos ácidos urónicos (ácido 4-O-metil-glucurónico y ácido galacturónico) (Cutter, 1986). De acuerdo con su conformación y arreglo se pueden encontrar en la forma de xilanos, mananos, galactanos, glucanos, xiloglucanos y sustancias pécticas (Cajo-Guerrero, 2017).

2.1.1.1.3. Lignina

Es un conjunto heterogéneo de anillos aromáticos unidos por enlaces éter de alquilo de conformación tridimensional que le dan rigidez a la pared celular de las plantas. Supone un mecanismo de defensa para las plantas al prevenir la unión de enzimas provenientes de microorganismos ajenos a ellas, es por esto que al momento de la hidrólisis lo mejor es disponer de la lignina a la brevedad (Cajo-Guerrero, 2017).

2.1.1.2. Oloste

Son los restos desgranados del maíz, que funciona como almacén de nutrientes para la planta. Su conformación en base seca es de 45% celulosa, 35% hemicelulosa (xilano, principalmente) y 15% lignina. Esto lo hace un potencial sustrato para la producción de xilanasas.

Sin embargo, en México no se aprovecha al máximo de su potencial al ser utilizado como forraje y para prevenir la pérdida de nutrientes de la tierra, ambas actividades tienen rendimientos muy bajos y no son redituables, por lo que muchos optan por la quema de los mismos (Robledo-Olivo, 2012).

2.1.1.3. Rastrojo de maíz

El rastrojo del maíz es todo aquello que resta de la planta posterior a la cosecha del maíz. Tan sólo en la parte aérea de la planta representa un 50% de la biomasa del maíz (Muñoz-Tlahuiz, 2013). Está conformado en un 29.6% por hemicelulosa, en un 36.7% por celulosa y en un 9.3% por lignina (Jiménez-Duarte, 1984). Del total de los residuos agrícolas en México, representa el 58%, y se utiliza principalmente como alimento para ganado, sin embargo, su

valor alimenticio es muy bajo, además de tener una baja digestibilidad, por lo que, al igual que el olote, tiene muy pocos rendimientos en su aprovechamiento (Fuentes, 2001).

2.1.1.4. Bagazo de cerveza

Es el producto resultante de la industria cervecera resultante del prensado y filtrado tras la sacarificación de la malta. Es un producto rico en proteína (26%) y en fibra (44%), con un relativamente bajo contenido de lignina (5%).

Representa un gran problema en la industria porque hasta la fecha no se le ha dado ningún valor comercial, lo emplean como alimento para ganado y abono, lo que tampoco es rentable pues tienen que vender el residuo muy barato para que un tercero pueda disponer de él rápidamente.

Uno de sus posibles usos radica en la obtención de melazas para la producción de etanol, sin embargo, no ha habido estudios recientes que corroboren su efectividad como materia prima (Arimuya-Manamu, 2014).

2.1.2. Hidrólisis enzimática

La materia lignocelulósica por sí misma no tiene ninguna utilidad, sin embargo, si se descompone en sus monómeros (a excepción de la lignina) es posible aprovecharla como sustrato para un sinnúmero de microorganismos, es por esto que existen enzimas que rompen los enlaces existentes entre los polímeros, permitiendo el acceso a estos productos de hidrólisis (Sun, 2002).

La hidrólisis enzimática ofrece una opción de descomponer los polímeros de manera amigable, ahorrando energía en procesos de calentamiento y previniendo la adición de procesos de neutralización como ocurre con la hidrólisis ácida o la alcalina, por consiguiente, previene consumos masivos de agua en el proceso. A pesar de estas ventajas, su costo se vuelve un impedimento para su implementación al representar entre el 30 y el 50% del costo operativo total (Chen, 2010).

2.1.2.1. Celulasas

La celulasa es un complejo enzimático que actúa de forma coordinada para degradar la celulosa. Este complejo tiene 3 componentes principales: las endo- β -glucanasas (hidrolizan los enlaces β -glucosídicos al interior de la celulosa, disminuyendo la longitud de las

cadena), las exo- β -glucanasas (que cortan los extremos no reductores, previamente escindidos para formar unidades de celobiosa) y las celobiasas (que descomponen la celobiosa en dos unidades de glucosa).

Las celulasas pueden sintetizarse por distintos tipos de microorganismos, principalmente bacterias y hongos, sin embargo, su efectividad es variable, convirtiéndose en pocos los microorganismos capaces de hidrolizar celulosa cristalina (Ferrer-Marcelo, 2011).

2.1.2.2. Xilanasas

Así como con las celulasas, las xilanasas están compuestas de un complejo enzimático, donde la enzima clave es la endo- β -xilanasas, que rompe los enlaces internos del xilano, generando oligosacáridos del mismo. Una vez que se obtienen estas, actúa todo un conjunto de enzimas para llevar esos oligosacáridos a azúcares reductores: β - (1,4)-xilanasas, β -xilosidasa, α -L-arabinofuranosidasa, α -glucuronidasa, acetil-xilano-esterasa y ácido fenólico-esterasa.

Las xilanasas se obtienen principalmente de hongos, sin embargo, se pueden sintetizar por distintos microorganismos (Robledo-Olivo, 2012).

2.1.3. *Cellulomonas flavigena*

2.1.3.1. Generalidades

Cellulomonas es un género de bacterias conocido por estar formado por bacilos Gram positivos, quimiorganotrofos de color amarillo, anaerobios facultativos con metabolismo tanto respiratorio como fermentativo. Una de sus características principales es que es un género celulolítico (Holt, 1994).

Cellulomonas flavigena es una bacteria de este género caracterizada por su alta actividad celulasa y xilanasas, además de su capacidad para secretar estas enzimas al medio de cultivo en el que se desarrolla (Rojas-Rejón, 2011).

2.1.3.2. Producción de celulasas y xilanasas a nivel molecular

Si bien el sistema promotor y represor de *Cellulomonas flavigena* no está completamente descubierto se sabe que el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) es un factor importante. En un medio con altas concentraciones de glucosa se inhibe la producción de

endoglucanasas, sin embargo, al aumentar los niveles de AMPc, disminuye el efecto represor de la glucosa (Sánchez-Gutiérrez, 2013).

Genes asociados a la producción de celulasas son *celcflA* y *celcflB* que codifican a una exoglucanasa (celA) y a una endoglucanasa (celB), respectivamente. Estos genes parecen estar asociados en un casete con una secuencia promotora en común que todavía no se ha descubierto, sin embargo, puede ser una clave para controlar la producción de celulasas a nivel genético (Jiménez-Bueno, 2011).

En lo que refiere a las xilanasas, son un tema más complicado, genéticamente, pues la composición de los xilanos es muy variable, por tanto, la identificación de xilanasas específicas se complica, hasta ahora hay un gen asociado a xilanasas que se ha identificado como común en varios microorganismos celulolíticos: el gen XIA, sin embargo, se desconoce todavía si está asociado a algún sistema promotor/represor (Vázquez-Ramírez, 2011).

2.1.4. Metodología

2.1.4.1. Para la preparación de curvas de calibración

2.1.4.1.1. Para la preparación de la curva de calibración para el método de medición de azúcares reductores con DNS

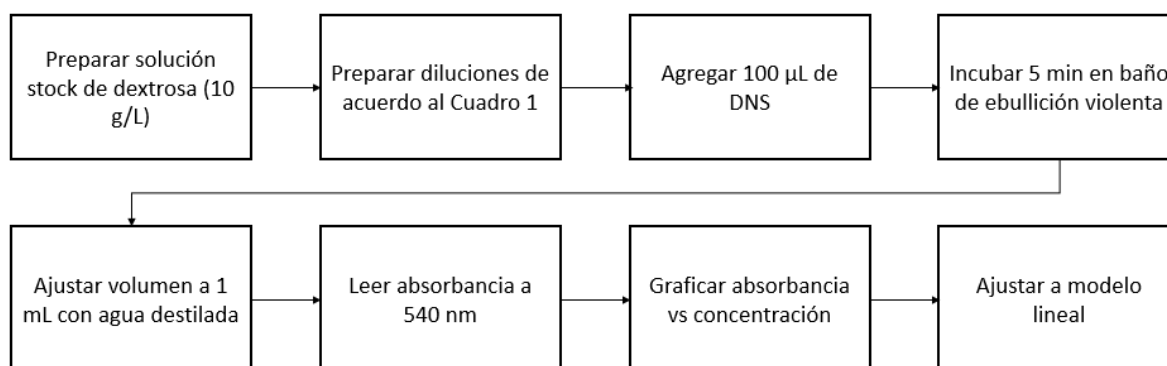


Figura 2. Diagrama de flujo de la preparación de la curva de calibración del método para medir azúcares reductores con ácido dinitrosalicílico (DNS).

Cuadro 1. Volúmenes para la preparación de la curva de calibración del método de medición de azúcares reductores con DNS.

Sln. Glucosa (µL)	Agua Destilada (µL)	Concentración (g/L)
0.00	100.00	0.000

2.25	97.75	0.225
5.00	95.00	0.500
7.50	92.50	0.750
10.00	90.00	1.000

2.1.4.1.2. Para la preparación de la curva de calibración del método de medición de proteína soluble total con el reactivo de Bradford

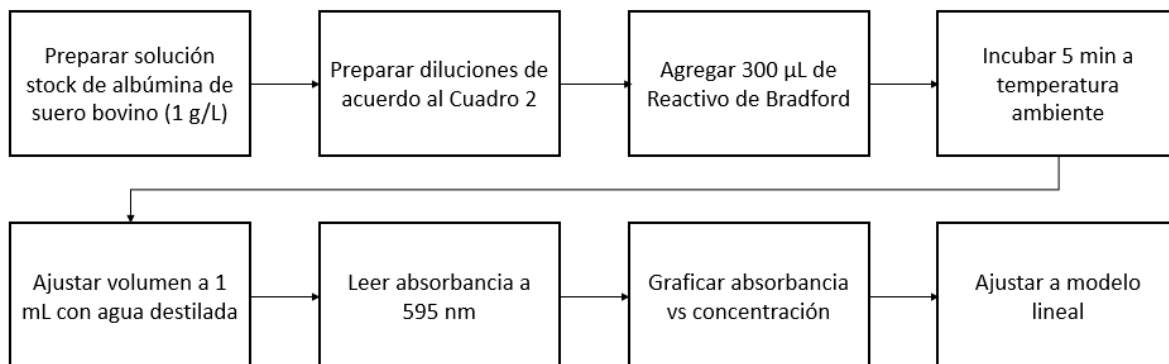


Figura 3. Diagrama de flujo para la preparación de la curva de calibración del método de medición de proteína soluble total con el reactivo de Bradford.

Cuadro 2. Volúmenes para la preparación de la curva de calibración del método de medición de proteína soluble total con el reactivo de Bradford.

Sln. de proteína (μL)	Agua destilada (μL)	Concentración (g/L)
0	300	0.000
20	280	0.003
30	270	0.005
40	260	0.007
50	250	0.008

2.1.4.2. Para la caracterización de *C. flavigena* PR-22

2.1.4.2.1. Para la Tinción de Gram

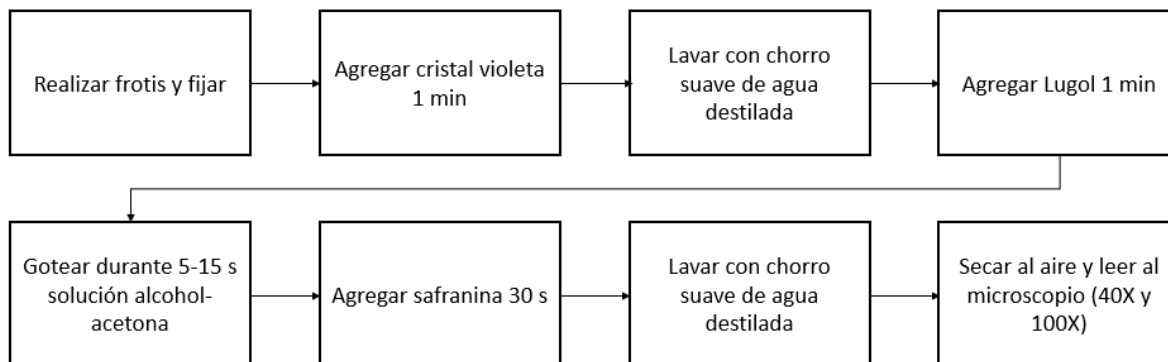


Figura 4. Diagrama de flujo para la preparación de una Tinción de Gram.

2.1.4.2.2. Para la prueba del efecto del agua corriente sobre el crecimiento de *C. flavigena* PR-22

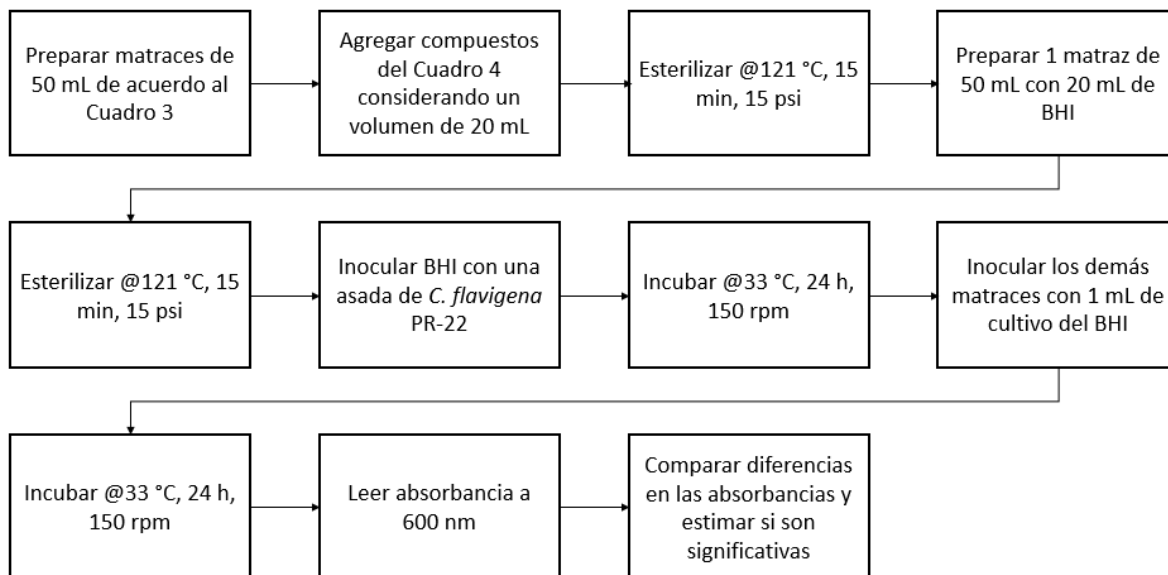


Figura 5. Diagrama de flujo para la prueba del efecto del agua corriente sobre el crecimiento de *C. flavigena* PR-22.

Cuadro 3. Volúmenes para la prueba del efecto del agua corriente sobre *C. flavigena* PR-22.

Buffer fosfato (mL)	Glucosa 100 g/L (mL)	Agua corriente (mL)	Agua destilada (mL)
2	2	0	16
2	2	4	12

2	2	8	8
2	2	12	4
2	2	16	0

Cuadro 4. Concentración de compuestos que conforman el medio empleado para la prueba del efecto del agua.

Compuesto	Concentración (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5
NaCl	5.5
KH ₂ PO ₄	3.5
CaCl ₂	0.1
MgSO ₄	0.1
Extracto de levadura (EL)	0.6

2.1.4.2.3. Para la prueba del efecto del CaCl₂ sobre el crecimiento de *C. flavigena* PR-22

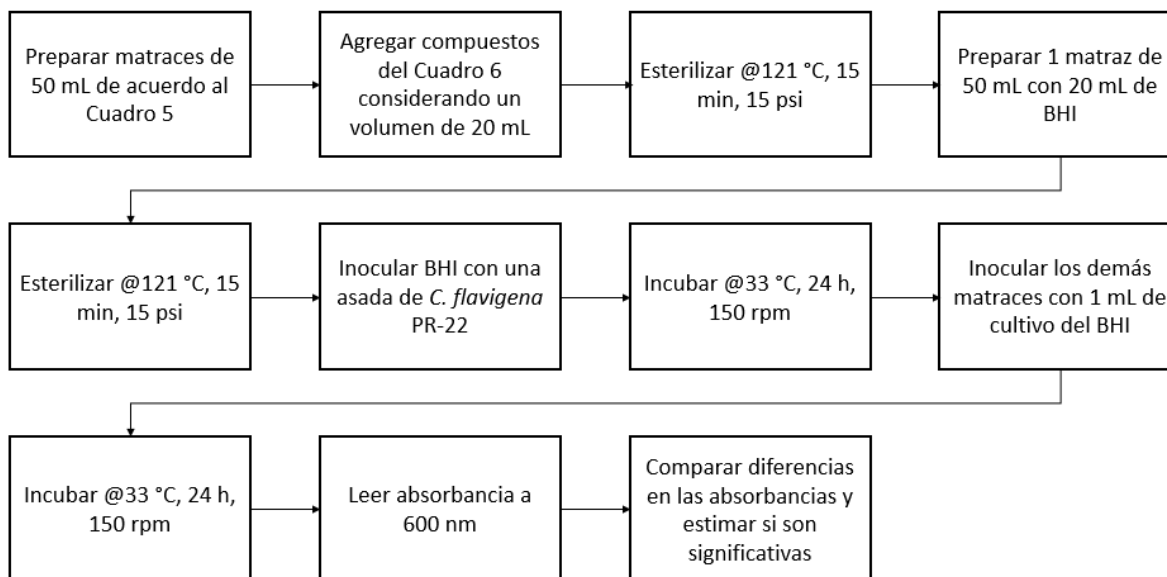


Figura 6. Diagrama de flujo para la prueba del efecto del CaCl₂ sobre el crecimiento de *C. flavigena* PR-22.

Cuadro 5. Volúmenes para la prueba del efecto del CaCl₂ sobre *C. flavigena* PR-22.

Buffer fosfato (mL)	Glucosa 100 g/L (mL)	Sales (mL)	CaCl ₂ (g/L)
2	2	16	0
2	2	16	0.05
2	2	16	0.1
2	2	16	0.2

Cuadro 6. Concentración de compuestos que conforman el medio empleado para la prueba del efecto del CaCl_2 .

Compuesto	Concentración (g/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.5
NaCl	5.5
KH_2PO_4	3.5
MgSO_4	0.1
EL	0.6

2.1.4.3. Para la evaluación de la reacción de *C. flavigena* PR-22 a diferentes condiciones de estrés metabólico

2.1.4.3.1. Para la determinación de la actividad papel filtrasa

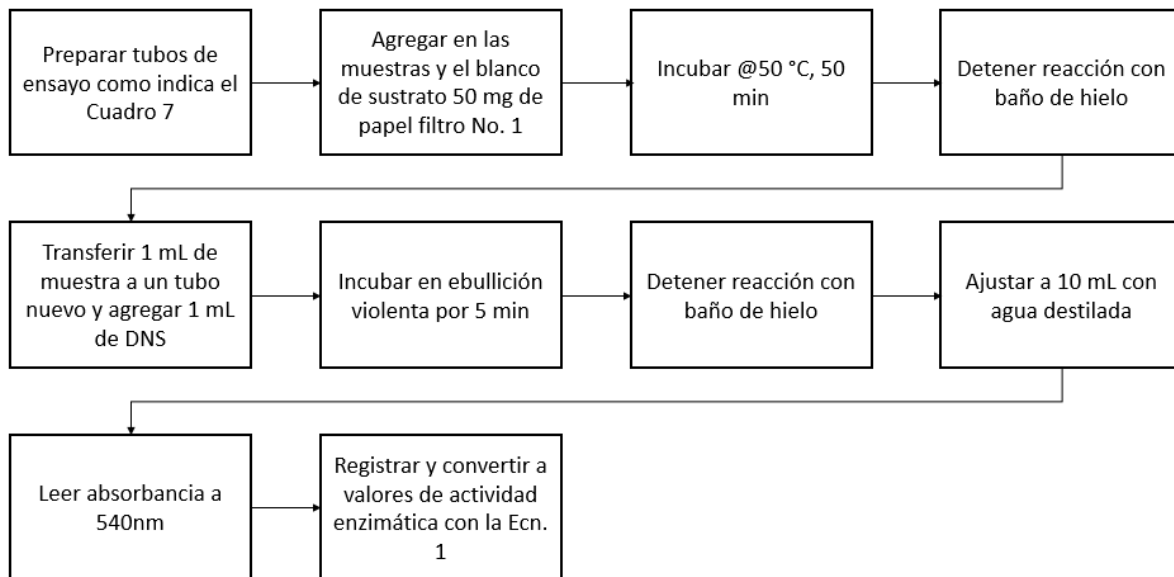


Figura 7. Diagrama de flujo para la determinación de la actividad papel filtrasa.

Cuadro 7. Preparación de muestras para la medición de la actividad papel filtrasa.

	Buffer ftalato (mL)	Extracto enzimático (mL)	Papel filtro (mg)
Blanco de reactivos	1.5	-	-
Blanco de sustrato	1.5	-	50
Blanco enzimático	1.0	0.5	-
Muestra	1.0	0.5	50

$$AH = \frac{V_{rx}[A.R.]_{Liberados}}{V_{enzima}M_w t} \text{ (Ecn. 1)}$$

Donde AH representa la actividad hidrolítica del extracto; V_{rx} , el volumen de reacción; $[A.R.]_{Liberados}$, la concentración de azúcares reductores liberados al medio; V_{enzima} , el volumen del extracto crudo enzimático; M_w , el peso molecular del azúcar reductor y t es el tiempo de reacción.

2.1.4.3.2. Para la determinación de la actividad aldonasa

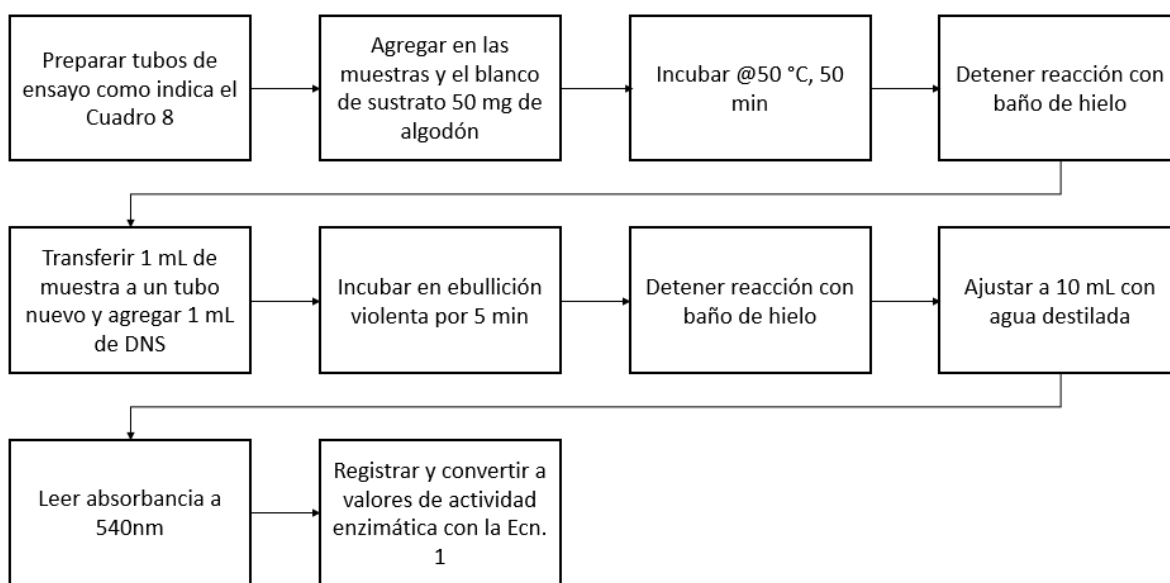


Figura 8. Diagrama de flujo para la determinación de la actividad aldonasa.

Cuadro 8. Preparación de muestras para la medición de la actividad aldonasa.

	Buffer ftalato (mL)	Extracto enzimático (mL)	Algodón (mg)
Blanco de reactivos	1.5	-	-
Blanco de sustrato	1.5	-	50
Blanco enzimático	1.0	0.5	-
Muestra	1.0	0.5	50

2.1.4.3.3. Para la determinación de la actividad carboximetilcelulasa (CMCasa)

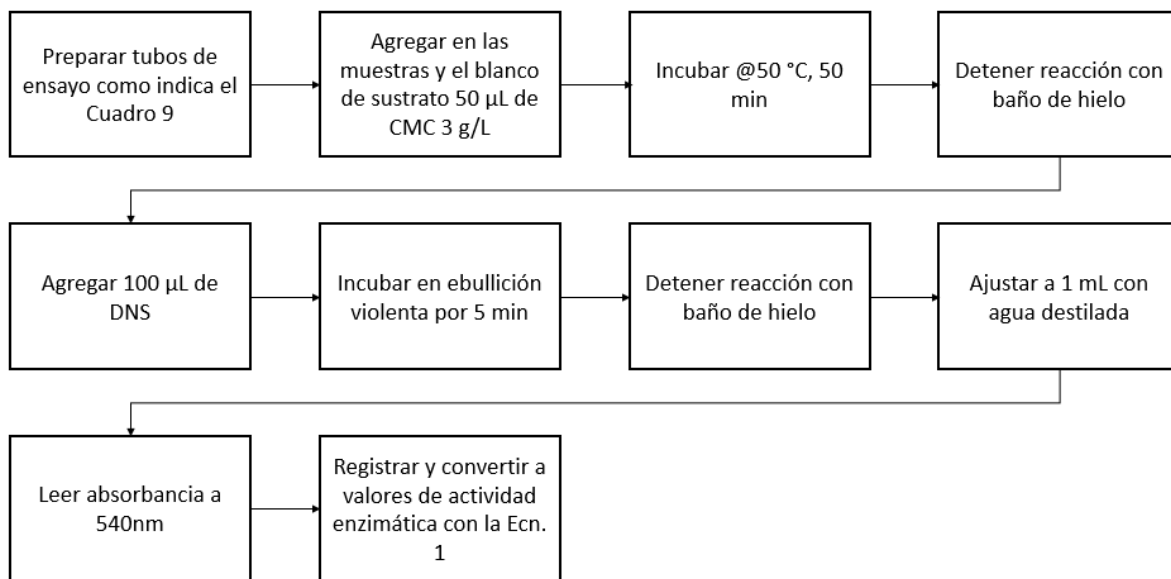


Figura 9. Diagrama de flujo para la determinación de la actividad CMCasa.

Cuadro 9. Preparación de muestras para la medición de la actividad CMCasa.

	Buffer ftalato (µL)	Extracto enzimático (µL)	CMC 3 g/L (µL)
Blanco de reactivos	100	-	-
Blanco de sustrato	50	-	50
Blanco enzimático	75	25	-
Muestra	25	25	50

2.1.4.3.4. Para la evaluación del efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de distintas celulasas

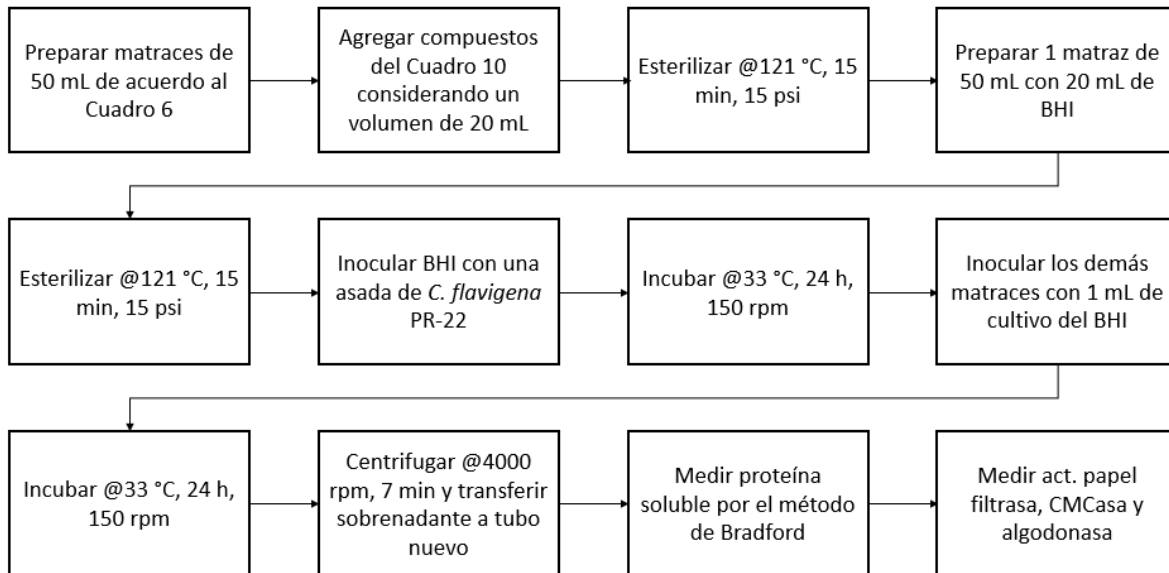


Figura 10. Diagrama de flujo para la evaluación del efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de distintas celulasas.

Cuadro 10. Preparación de muestras para la evaluación del efecto de diversas fuentes de carbono en la producción de celulasas.

Compuesto	Concentración (g/L)
Xilana	3
Algodón	3
R300	3
R200	3
CMC	3
OLT	3

2.1.4.3.5. Para la evaluación del efecto de la relación carbono/nitrógeno (C/N) en la producción de CMCasa

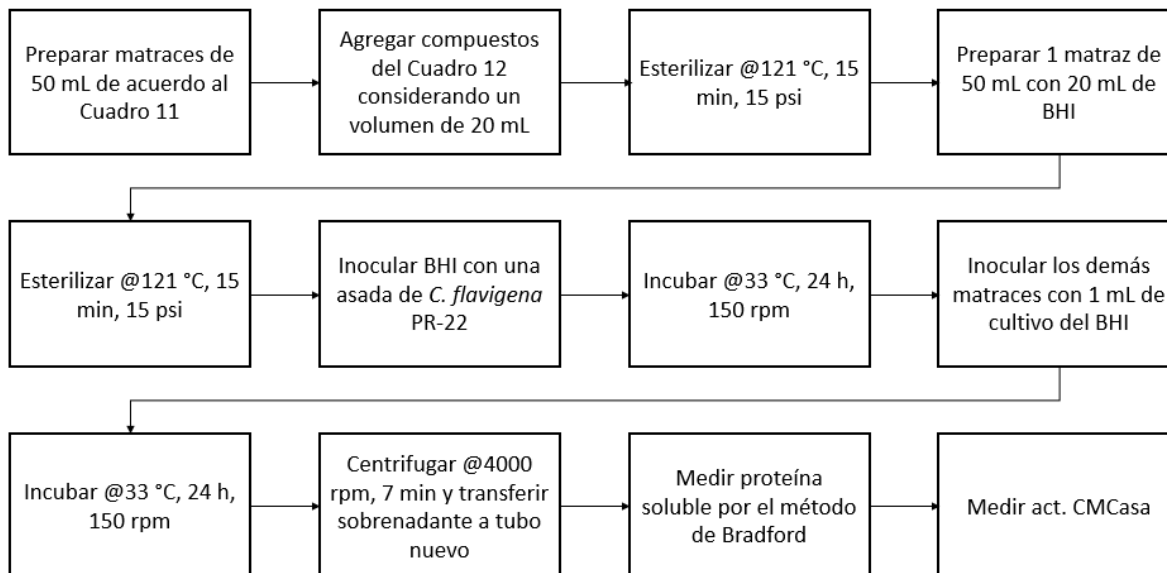


Figura 11. Diagrama de flujo para la evaluación del efecto de la relación C/N en la producción de CMCasa.

Cuadro 11. Preparación de muestras para la evaluación del efecto de la relación C/N en la producción de CMCasa.

Compuesto	Concentración (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5
NaCl	5.5
KH ₂ PO ₄	3.5
MgSO ₄	0.1
F de C.	3.0

Cuadro 12. Relaciones C/N empleadas para el experimento.

C/N	EL (g/L)
1	3.000
3	1.000
5	0.600
8	0.375

2.1.4.3.6. Para la evaluación del efecto del uso de malta gastada como fuente de carbono para la producción por lote de CMCasa en un BioBundle Autoclaveable de 7 L.

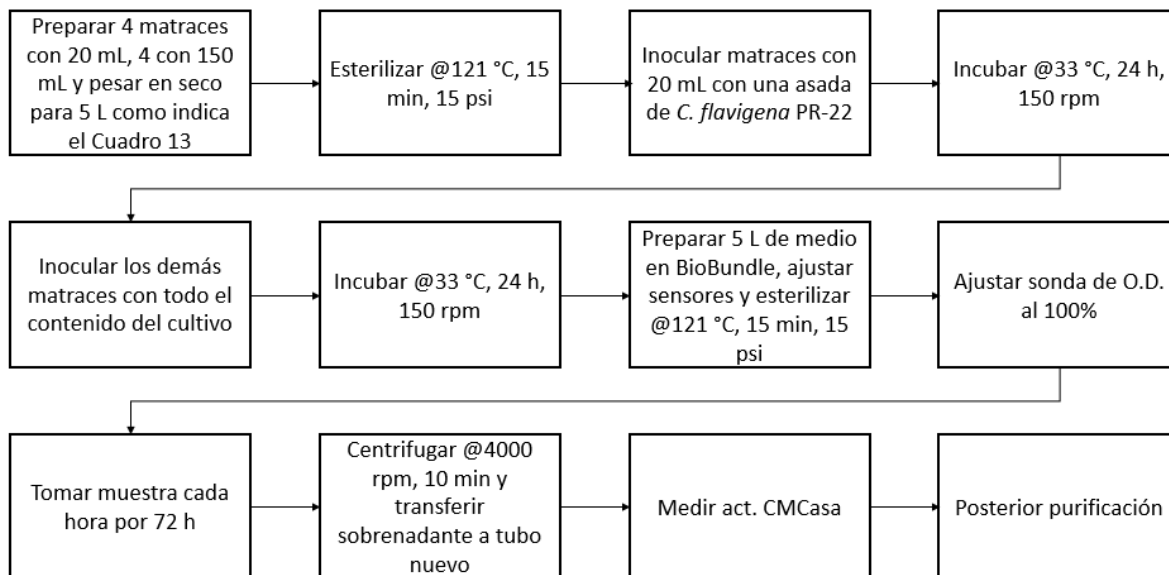


Figura 12. Diagrama de flujo para la evaluación del efecto del uso de malta gastada como fuente de carbono para la producción por lote de CMCasa en un BioBundle Autoclaveable de 7 L.

Cuadro 13. Presentación del medio de cultivo.

Compuesto	Concentración (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5
NaCl	5.5
KH ₂ PO ₄	3.5
MgSO ₄	0.1
Malta	10
EL	10

2.1.4.3.6. Para la evaluación del efecto del uso de olote como fuente de carbono para la producción por lote de xilanas en biorreactor Frasco Schott de 1L.

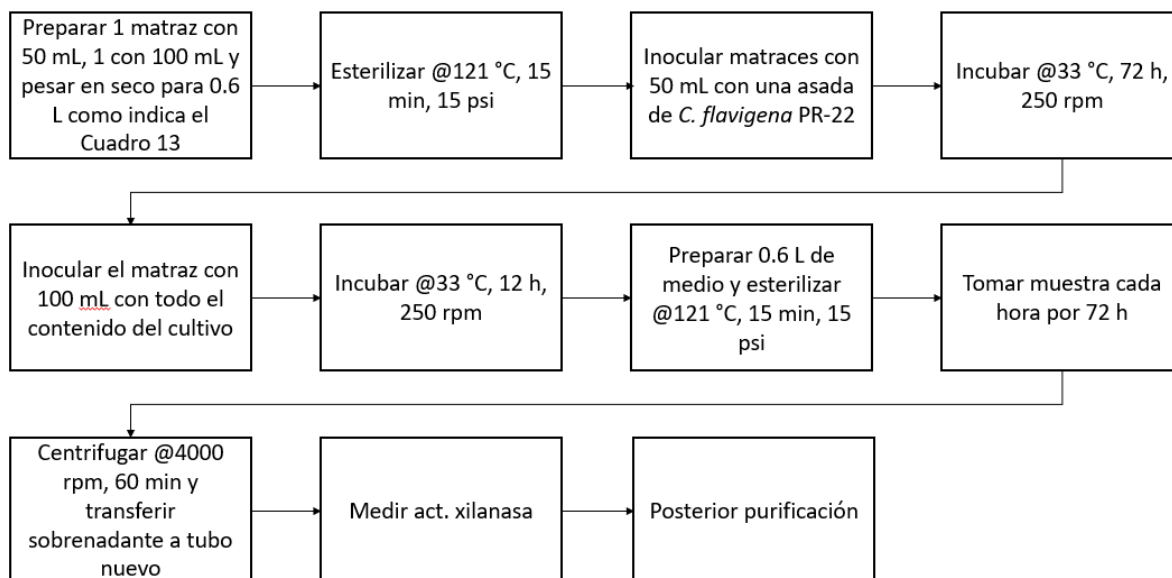


Figura 13. Diagrama de flujo para la evaluación del efecto del uso de olote como fuente de carbono para la producción por lote de xilanasa en biorreactor Frasco Schott de 1 L.

2.1.4.3.7. Para la determinación de la actividad xilanasa.

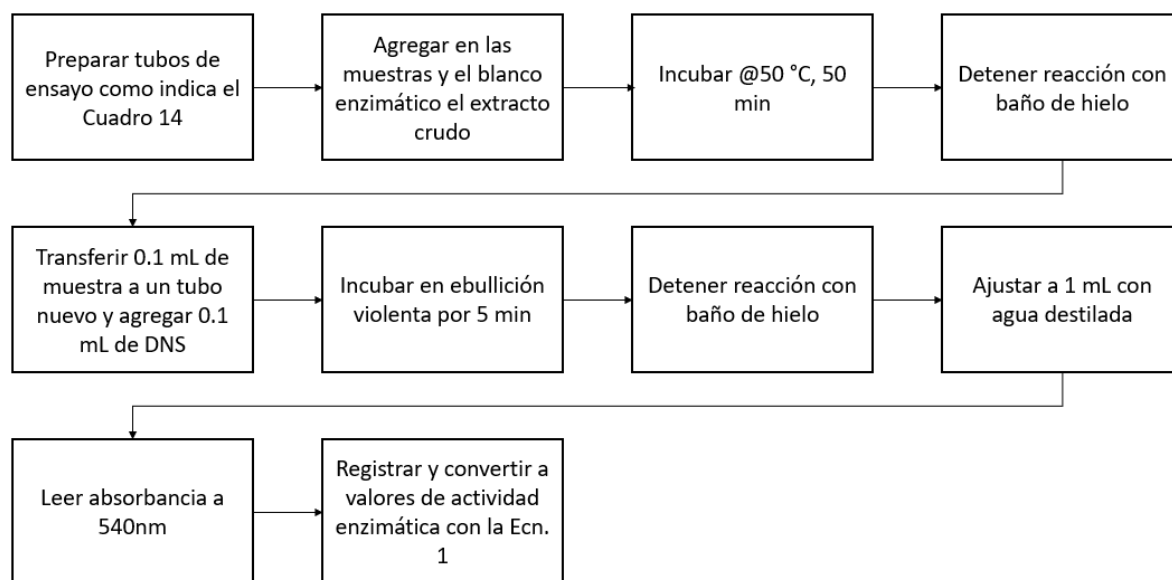


Figura 14. Diagrama de flujo para la determinación de la actividad xilanasa.

Cuadro 14. Preparación de muestras para la medición de la actividad xilanasa.

	Buffer citrato-fosfato (mL)	Extracto enzimático (mL)	Xilano 1% (mL)
Blanco de reactivos	1.0	-	-
Blanco de sustrato	0.2	-	0.8
Blanco enzimático	0.9	0.1	-
Muestra	0.1	0.1	0.8

2.1.4.3.8. Para el cultivo en reactor usando R150 y glucosa como fuente de carbono

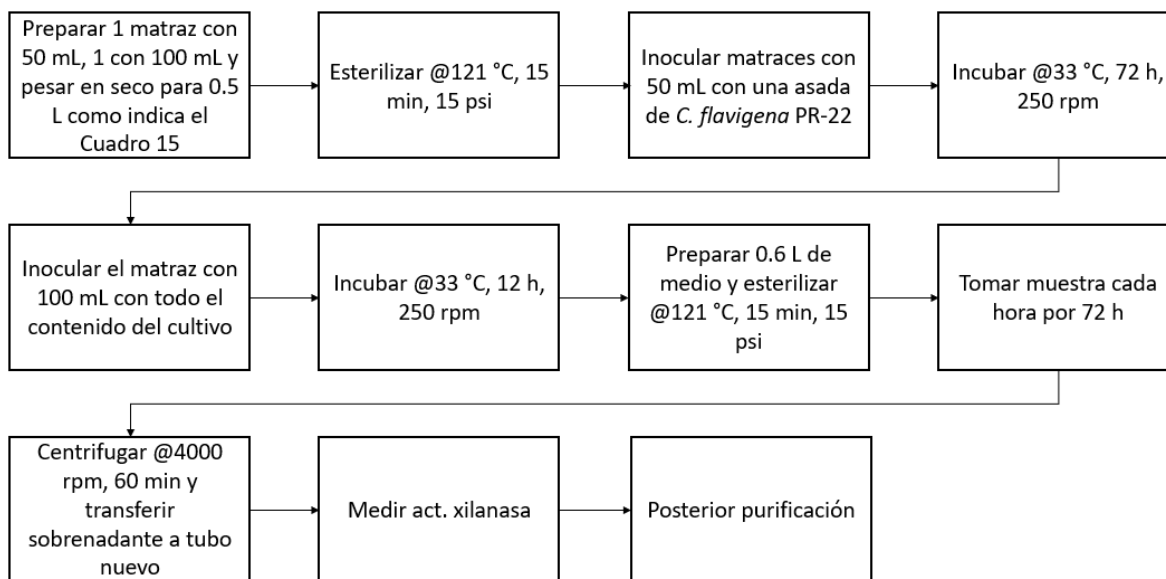


Figura 15. Diagrama de flujo para el cultivo en reactor usando R150 y glucosa como fuente de carbono.

Cuadro 15. Preparación de medios de cultivo para cultivos en reactor.

Compuesto	Concentración (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5
NaCl	5.5
KH ₂ PO ₄	3.5
MgSO ₄	0.1
F. de carbono	10
EL	10

2.1.4.3.9. Para la superficie de respuesta de *C. flavigena* PR-22 a diferentes fuentes de carbono con relación C/N variable.

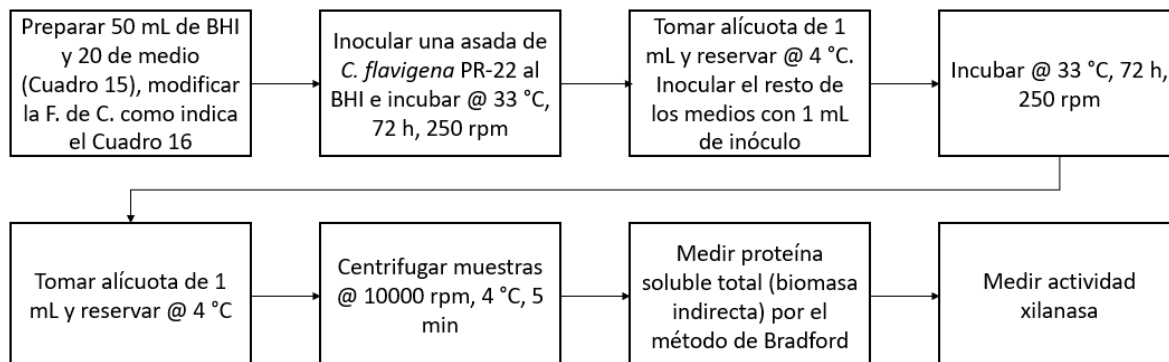


Figura 16. Diagrama de flujo para el experimento de respuesta de *C. flavigena* PR-22 a diferentes fuentes de carbono con relación C/N variable.

Cuadro 16. Fuentes de carbono y relaciones C: N problema.

F. de carbono	Relación C/N (g/g)	Réplicas
Algodón	1	2
	5.5	2
	10	1
Glicerol	1	1
	5.5	2
	7.75	1
Glucosa	10	2
	1	2
	5.5	2
Hojas secas	10	2
	1	1
	5.5	2
Leche	7.75	1
	10	1
	1	1
Olote	5.5	2
	10	2
	1	1
R150	3.25	1
	5.5	2
	7.75	1
	10	1
	1	2

	5.5	2
	7.75	1
	10	1
Tela	1	1
	5.5	2
	10	2

2.2. Planeación y seguimiento del proyecto

2.2.1. Descripción del proyecto

El proyecto consiste en la modificación de las condiciones de crecimiento de la cepa *Cellulomonas flavigena* PR-22 hasta encontrar la combinación de estas que favorezca la producción de celulasas y xilanasas, que tienen un alto valor agregado en el mercado. En el proyecto, además, se emplean como sustratos residuos agroindustriales, que, de otra manera, serían desechados o utilizados de manera incorrecta al generar productos de bajo valor y bajos rendimientos.

Actualmente, en el trabajo de laboratorio se ha logrado mantener un cultivo estable de *C. flavigena*, de la cual ya se conocen algunas de sus características morfológicas por la observación al microscopio. También, después de varias corridas experimentales se han adaptado los medios de cultivo reportados en la literatura para permitir un crecimiento correcto de la bacteria bajo las condiciones de la zona (como la salinidad del agua corriente, por ejemplo).

Se ha observado el desempeño de la bacteria para producir celulasas midiendo su actividad bajo distintas condiciones de cultivo, como modificar la relación C/N y modificar las fuentes de carbono del medio de cultivo. Además, ya se implementaron diversas corridas en biorreactor con resultados favorables.

Se ha encontrado que la actividad celulasa es muy baja en comparación con la actividad xilanasas de la cepa. Esto es debido a que la cepa es mutante estimulada para la producción de la segunda. Finalmente, se abordó la producción de xilanasas para encontrar los sustratos que de manera basal y sin ningún tipo de tratamiento previo la estimulan.

2.2.2. Plan de trabajo

2.2.2.1. Actividades

2.2.2.1.1. Preoperativas

1. Planteamiento de los alcances y objetivos del proyecto.
2. Investigación bibliográfica acerca de las metodologías empleadas para el desarrollo del proyecto.
3. Elaboración del diagrama de flujo de estos métodos.
4. Calendarización de las actividades experimentales conforme a los objetivos semanales
5. Retroalimentación por parte del asesor y asignación de nuevas tareas.

2.2.2.1.2. Operativas

1. Caracterización de la cepa.
 - a. Teñir e identificar la morfología de *Cellulomonas flavigena* PR-22.
 - b. Identificar el efecto del agua corriente en el crecimiento de la bacteria.
 - c. Evaluar si la concentración de CaCl_2 es relevante para el crecimiento de *C. flavigena*.
2. Realización de curvas de calibración para pruebas posteriores.
 - a. Preparación de los reactivos de Bradford y DNS.
 - b. Realización de sus respectivas curvas de calibración a partir de los estándares correspondientes.
3. Exposición a *C. flavigena* a diferentes condiciones de cultivo.
 - a. Evaluación de la producción de celulasas comparando diferentes protocolos para medir su actividad y fuentes de carbono.
 - b. Evaluación de la producción de celulasas modificando la relación C/N.
 - c. Cultivo en un biorreactor de tanque agitado, con una nueva fuente de carbono y evaluación de la producción de enzimas.
 - d. Evaluación de la producción de xilanasas en biorreactor.
 - e. Cultivo en diferentes fuentes de carbono y relaciones C/N para demostrar la expresión diferencial de xilanasas.

2.2.2.2. Recursos necesarios

Cuadro 17. Equipos empleados a lo largo del proyecto.

Equipo

Imagen

Microscopio óptico con entrada a la computadora



Autoclave



Espectrofotómetro UV-Vis



Centrífuga para tubos de 15-50 mL



BioBundle autoclaveable de 7 L



Biorreactores Frasco Schott de 1 L



Centrífuga para tubos de 1.5-2 mL



Lector de microplaca



Incubadora rotatoria



2.2.2.3. Fechas previstas

1. El proyecto comenzó en enero de 2017 con distintos objetivos, que se vieron modificados a partir de junio del mismo año.
2. En junio de 2017 se obtuvo una cepa nueva con resultados poco fructíferos.
3. En agosto de ese mismo año se obtuvo *C. flavigena* PR-22 y se tiñó.
4. De agosto a diciembre de 2017 la cepa estuvo en proceso de acondicionamiento y mantenimiento hasta lograr un crecimiento estable.
5. A partir de enero de 2018 se comenzaron a realizar reuniones semanales para la evaluación de resultados y asignación de nuevas tareas.
 - a. En la semana del 15 al 20 de enero se procedió a reactivar la cepa.
 - b. Del 22 al 26 de enero se realizó el análisis del efecto del agua corriente junto a sus pruebas experimentales.
 - c. Del 29 de enero al 2 de febrero se realizó el análisis del efecto del cloruro de calcio sobre el crecimiento de la bacteria.
 - d. Del 5 al 16 de febrero se realizaron labores de conservación de la cepa en cajas Petri y se prepararon los medios para futuras conservaciones. Además de inducir la producción de celulasa a diferentes fuentes de carbono.

- e. Del 19 al 23 de febrero se preparó el reactivo de DNS, para evaluarlo en una curva de calibración el 28 de febrero, junto con la medición de la primera actividad enzimática, la actividad papel filtrasa en cultivos con diferentes fuentes de carbono.
 - f. Del 5 al 9 de marzo se preparó reactivo de Bradford y se realizó su respectiva curva de calibración. El 6 de marzo se realizó la prueba de actividad aldonasa para el experimento de la evaluación de distintas fuentes de carbono. El 7 de marzo se realizó la actividad CMCasa para el mismo experimento.
 - g. Del 12 al 15 de marzo se prepararon e indujeron los medios para la prueba de la relación C/N para distintas fuentes de carbono, además de centrifugar todas las muestras.
 - h. El 4 de abril se evaluó la actividad CMCasa de estos extractos
 - i. A partir del 9 de abril se planteó el escalamiento del proceso a biorreactor utilizando malta gastada como fuente de carbono. Se realizó el experimento y se separó el extracto de los sólidos para la medición de la actividad CMCasa el 23 de abril.
 - j. Se buscó concentrar la celulasa del extracto, sin embargo, al tener resultados desfavorables se prescindió del mismo.
6. Después de una pausa en el proyecto, se reanudaron actividades en agosto de 2018.
- a. En la semana del 20 al 24 de agosto se comenzaron a preparar medios de inducción y se reactivó la cepa para una primera cinética, que se llevó a cabo en la semana del 27 al 31 del mismo mes.
 - b. En la semana del 3 al 7 de septiembre se procedió a separar la biomasa del extracto, lo que tomó más tiempo del que se esperaba. Se aprovechó para sacar cotizaciones de equipo y reactivos necesarios para posteriores etapas de purificación.
 - c. En la semana del 10 al 14 se realizaron las pruebas bioquímicas necesarias de actividad olatasa y se puso en marcha un nuevo reactor.
 - d. La semana del 17 al 21 consistió en elaborar un nuevo protocolo para la medición de la actividad enzimática y la preparación de reactivos para llevarla a cabo.
 - e. Por motivos de salud del 24 de septiembre al 5 de octubre no se llevaron a cabo actividades experimentales.
 - f. Del 8 al 19 de octubre se analizaron los datos de la cinética previa con el nuevo protocolo de medición de actividad enzimática y se procedió a realizar dos nuevas cinéticas, una empleando rastrojo como fuente de carbono y otra utilizando glucosa, que serviría como control.
 - g. Del 22 al 28 de octubre se comenzaron a procesar las muestras de las cinéticas de glucosa y rastrojo, sin embargo, por la falta de puntos y consistencia de estos se procedió a modificar el experimento a ser realizado a una superficie de respuesta.
 - h. En la semana del 3 a 7 de noviembre se comenzó el nuevo experimento preparando los diferentes medios de cultivo indicados en el diseño, además del preinóculo. Todas las muestras se inocularon el viernes 9 de noviembre.
 - i. En la semana del 12 al 16 de noviembre se procesaron las muestras, terminando así la actividad experimental.

2.2.3. Propuesta de mejora

- De la caracterización morfológica de la cepa, se espera repetir el frotis para mejorar la calidad de la imagen, puesto que se realizó con una muestra muy concentrada del microorganismo.
- Los ensayos sobre el agua y el cloruro de calcio fueron efectivos, sin embargo, pudieron haber mejorado su replicabilidad si se hubiera tenido más control con la turbidez provocada por el cloruro de calcio.
- Se ha observado que el orden en que se colocan las sales y el buffer de fosfatos influye en la velocidad de saturación del medio de cultivo por lo que encontrar el orden que minimice la saturación de sales en el medio es menester para aumentar la replicabilidad.
- Las actividades enzimáticas se han estado midiendo a un pH constante, sin embargo, al cambiar el buffer mencionado en la literatura, valdría la pena evaluar tanto el pH como la temperatura en que la actividad llega a su máximo.
- El tiempo de almacenamiento en refrigeración de los extractos enzimáticos debe ser el mínimo, puesto que se presta a que estos se contaminen por su uso constante.
- Los complejos enzimáticos en los extractos deben ser concentrados para registrar mayores actividades y tener un producto más puro y menos susceptible a la contaminación.
- En un futuro se espera evaluar las productividades y rendimientos en diferentes formas de operación del cultivo, como el cultivo continuo.

3. Resultados del trabajo profesional

3.1. Curvas de calibración

3.1.1. Curva de calibración de DNS

Los resultados obtenidos por la lectura de absorbancia del espectrofotómetro se pueden observar en el Cuadro 18, asociándolos con su respectiva concentración

Cuadro 18. Resultados de absorbancia vs concentración para la curva de calibración de DNS.

Concentración (g/L)	D.O. @540nm
0.000	0.000
0.225	0.279
0.500	0.621
0.750	0.993
1.000	1.231

Estos datos se graficaron y ajustaron a una ecuación lineal (Figura 17). Se observa que la ecuación obtenida tiene un valor de R^2 de 0.9968, lo que vuelve a la curva estadísticamente significativa. La efectividad de esta curva y del reactivo DNS preparado se evaluaron

midiendo los azúcares reductores en una solución con una concentración conocida de azúcares (en este caso un jugo), al coincidir los resultados se confirmó que el reactivo y el método estaban estandarizados.

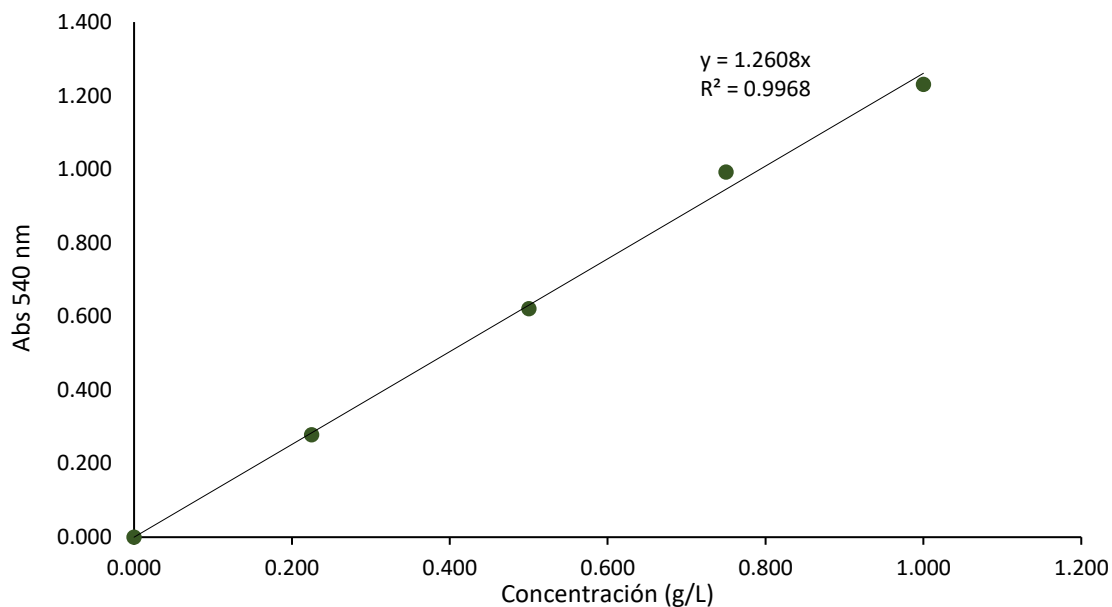


Figura 17. Curva de calibración de DNS.

3.1.2. Curva de calibración de Bradford

En el Cuadro 19 se observan los resultados de absorbancia obtenidos, comparándolos con la concentración de albúmina de suero bovino que les precede.

Cuadro 19. Resultados de absorbancia vs concentración para la curva de calibración de Bradford

Concentración (g/L)	Abs @ 595nm
0.000	0.000
0.003	0.115
0.005	0.162
0.007	0.173
0.008	0.241

Estos resultados se graficaron, siguiendo la metodología de la curva de DNS y se ajustaron de la misma manera a un modelo lineal, con un valor de R^2 de 0.9675, lo que lo vuelve estadísticamente significativo. Esto implica que la extrapolación de absorbancia a concentración de proteína soluble total es muy aproximada al valor real.

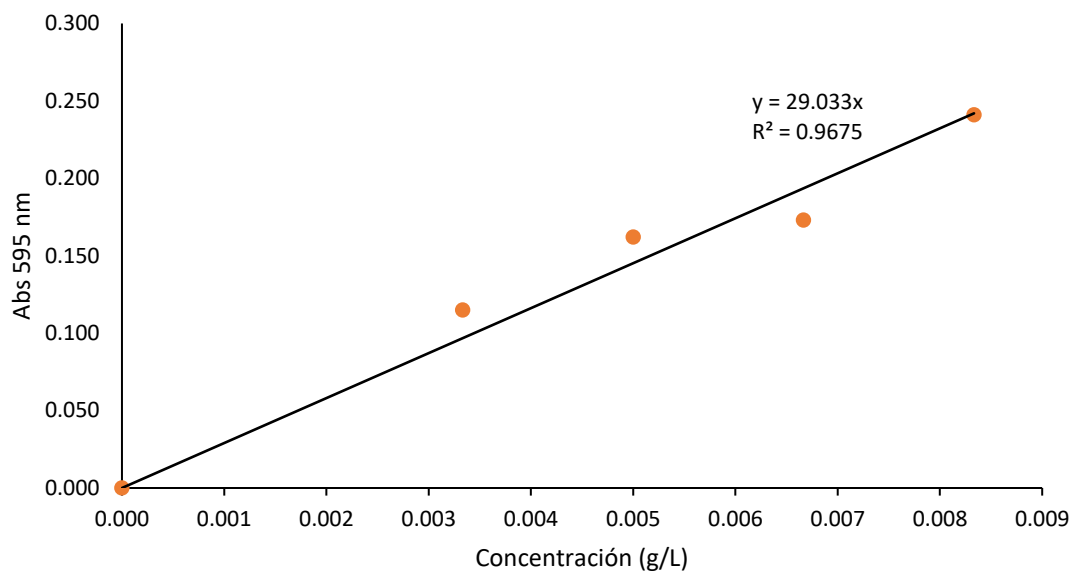


Figura 18. Curva de calibración de Bradford.

3.2. Caracterización de *C. flavigena* PR-22

3.2.1. Tinción de Gram

Para la caracterización de *C. flavigena* primero se buscó identificar su morfología y el color del que se tiñe por su pared celular al emplear la tinción de Gram. Sin embargo, esta tinción puede dar falsos negativos al lavarse rápidamente (Holt, 1994). En la Figura 17 se observan las colonias identificadas por esta tinción, a las que no se les aprecia el color por el método de obtención de la imagen.

Tanto en la Figura 19.A como 19.B se pueden observar una gran variedad de colonias aglutinadas a pesar de ser los objetivos con los que se deberían poder alcanzar a ver más colonias individuales. Este aglutinamiento posiblemente se debe a que en el frotis se colocaron más células de las que eran necesarias por lo que al momento de realizar esta técnica no se lograron aislar colonias.

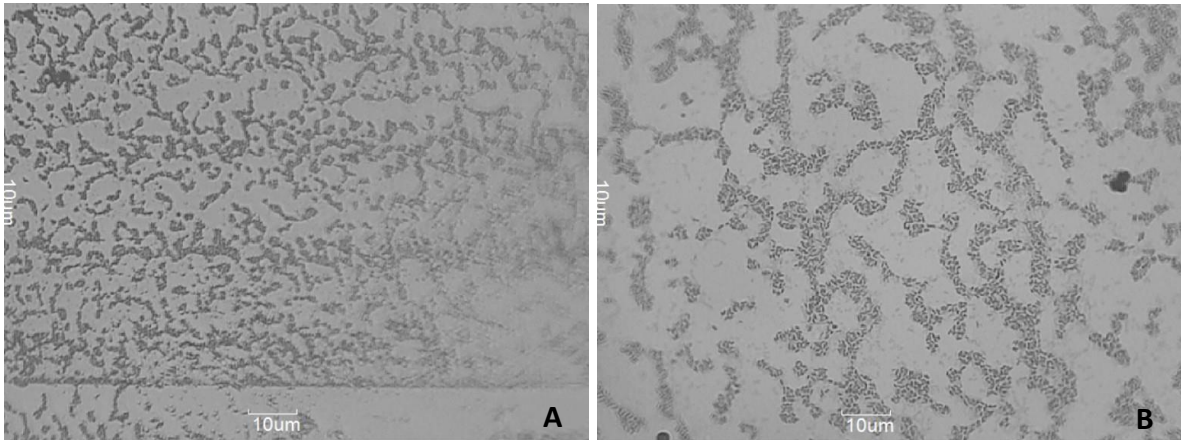


Figura 19. Tinción Gram de *Cellulomonas flavigena* PR-22 vista en microscopio óptico a A) 40X y a B) 100X.

En la Figura 20 se observa cómo deben verse las colonias características del género *Cellulomonas*, como se puede ver, es muy raro ver colonias individuales y tienden a agruparse en forma de 'V', como menciona la literatura (Holt, 1994). Finalmente se puede observar que las células se tiñen de un violeta decolorado, la muestra de que son Gram positivas, aunque susceptibles a decolorarse rápidamente.

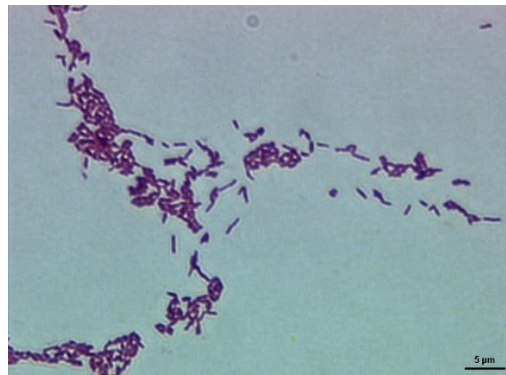


Figura 20. Tinción Gram de *Cellulomonas* sp. Fuente:

<http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/images/bakterie/mikro/cflav8h.jpg>

3.2.2. Evaluación del efecto del agua corriente en el crecimiento de *C. flavigena* PR-22

El efecto del agua corriente sobre *Cellulomonas* es un gran factor que considerar en este proyecto pues si se desea escalar a una planta de nivel industrial, no es factible preparar medios con agua destilada. Además, en la literatura la formulación de los medios minerales

está basada en la salinidad de la zona donde se realizó la investigación, así pues, se tienen que adaptar los medios de acuerdo con la dureza del agua de donde se está trabajando, en este caso, los laboratorios del ITESO.

Se encontró que el agua corriente del ITESO tiene una conductividad de 570 μS , lo que representa menos de la mitad de la conductividad en el Ramal de Tláhuac y Santa Catarina en el Distrito Federal con 1800 μL (que es de donde vienen los estudios previos con *Cellulomonas* y agua corriente), lo que podría indicar un déficit de sales en el medio, pues el agua tiene menor dureza. Además, no se conoce el nivel de cloración del agua (pues no es un dato constante de acuerdo con departamento de Servicios Generales del ITESO), lo que podría indicar la presencia de inhibidores del crecimiento de la bacteria.

En el Cuadro 20 se observan los resultados del agua corriente contra el agua destilada, preparadas a distintas concentraciones, comparándolas a partir de la turbidez asociada al crecimiento de *Cellulomonas*. El cambio en la densidad óptica fue tomado en cuenta como factor de crecimiento microbiano.

Cuadro 20. Resultados de la evaluación del efecto del agua de la llave en el crecimiento de *C. flavigena* PR-22.

#	Buffer fosfato (mL)	Glucosa 100 g/L (mL)	Agua de la llave (mL)	Agua destilada (mL)	$\Delta\text{D.O.}$ Promedio @ 600nm
1	2	2	0	16	0.80
2	2	2	4	12	0.55
3	2	2	8	8	0.72
4	2	2	12	4	0.79
5	2	2	16	0	0.61

Para evaluar qué tan significativas fueron estas diferencias se realizó un ANOVA de un factor en el software Minitab, con 95% de confianza (Valor F: 0.7, Valor P: 0.608) y se encontró que no hubo diferencias significativas entre el crecimiento a diferentes concentraciones de agua de la llave comparándola con el agua destilada. De hecho, se puede prescindir por completo del agua destilada al momento de preparar el medio de cultivo y *Cellulomonas* seguirá creciendo normalmente.

3.2.3. Evaluación del efecto del CaCl_2 sobre el crecimiento de *C. flavigena* PR-22

Siguiendo la línea de investigación del agua, se encontró que la dureza del agua podía ser representada principalmente en sales de calcio, lo que podría significar que al agregar más o menos calcio se podría inhibir o incrementar el crecimiento. Sin embargo, otro factor influye sobre esta sal y es que le da una turbidez al medio poco homogénea, además de afectar la saturación del medio, es por esto por lo que, se decidió examinar el efecto del cloruro de calcio (componente del medio mínimo básico) en el crecimiento de *Cellulomonas*, pues si el agua tiene las suficientes sales de calcio se podría prescindir de él. Los resultados del experimento se ven reflejados en el Cuadro 21.

Cuadro 21. Resultados de la evaluación del efecto del CaCl_2 sobre el crecimiento de *C. flavigena* PR-22.

#	Buffer fosfato (mL)	Glucosa 100 g/L (mL)	Sales (mL)	CaCl_2 (g/L)	$\Delta\text{D.O.}$ Promedio @ 600nm
1	2	2	16	0.00	0.194
2	2	2	16	0.05	0.260
3	2	2	16	0.10	0.138
4	2	2	16	0.20	0.149
5	2	2	16	1.00	0.016

Estos datos de nuevo se vieron sometidos a un ANOVA de un factor, de nuevo con una confianza del 95% y se encontró que de nuevo la diferencia no era significativa, por lo tanto, el cloruro de calcio no es un componente necesario del medio de cultivo si se trabaja con el agua corriente que surte al ITESO.

3.3. Respuesta de *C. flavigena* PR-22 a diferentes estímulos metabólicos

3.3.1. Producción de diversas celulasas variando las fuentes de carbono

Una vez definido un medio de cultivo base para el desarrollo de *Cellulomonas*, se compararon diversas fuentes de carbono como inductores de la producción de celulasas. Todas se agregaron a una misma concentración y se midió su actividad sobre diversos estados de la celulosa: papel filtro, algodón y CMC.

En el Cuadro 22 se pueden observar los resultados de este experimento para cada fuente de carbono (F. de C.) y cada determinación de actividad enzimática.

Cuadro 22. Resultados de la medición de las diferentes producciones de celulasa utilizando diversas fuentes de carbono.

F. de C.	Act. Papel filtrasa ($\mu\text{mol}/\text{min mL}$)	Act. Algodonasa ($\mu\text{mol}/\text{min mL}$)	Act CMCasa ($\mu\text{mol}/\text{min mL}$)
OLT	5.02E-03	2.12E-03	1.94E-03
CMC	5.29E-03	1.85E-03	1.76E-03
XIL	2.12E-02	2.54E-02	5.75E-02
R200	2.64E-04	1.32E-03	-3.53E-04
R300	5.29E-04	5.29E-04	0.00E+00
Alg	1.06E-03	2.64E-04	3.53E-04

Para facilitar el análisis de los datos del Cuadro 22, se decidieron ilustrar en una gráfica de barras (Figura 21).

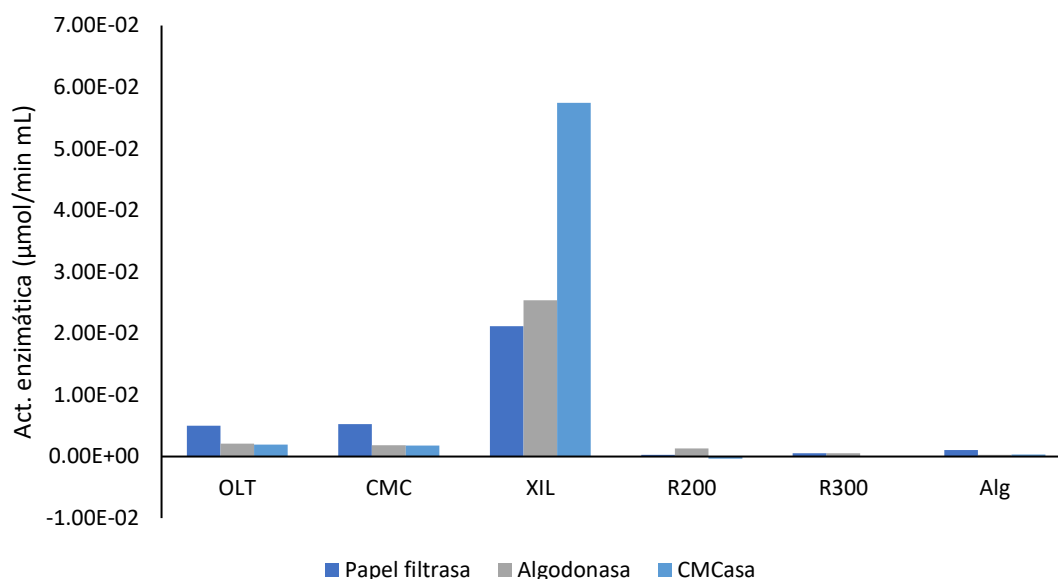


Figura 21. Gráfica de barras de las diferentes producciones de enzimas empleando diversas fuentes de carbono.

Se encontró que la xilana fue, por mucho, el mejor inductor de la actividad celulasa en cualquier presentación, esto es posiblemente debido a la gran cantidad y variedad de polímeros que se encuentran en ella, lo que incita a la producción de hidrolasas que pueden actuar como endoglucanasas de manera inespecífica. Los segundos mejores inductores fueron el olote y el CMC. Se sabe que el olote es rico en hemicelulosa, por lo que esto pudo haber estimulado a la producción de endoglucanasas (como en el caso de la xilana) inespecíficas que pudieran actuar sobre la celulosa. Sin embargo, se observa que entre más

cristalino es el estado de la celulosa, menor es la actividad de las enzimas generadas en el olote y en el CMC.

El problema del uso de la xilana como fuente de carbono es que es de difícil acceso y no es un residuo de la industria, por lo que no es rentable para la producción de celulasas, a pesar de ser la fuente de carbono que, en estas condiciones, estimula más la producción de celulasas.

3.3.2. Producción de CMCasa variando la relación C/N en diferentes fuentes de carbono

La relación C/N representa un factor muy importante al momento de producir proteínas, pues éstas se crean a partir del nitrógeno, esto lo vuelve un factor limitante, junto al carbono al momento de diseñar un medio de cultivo, por lo que se debe encontrar la combinación de estos que maximicen la producción de enzimas.

Este experimento se desarrolló únicamente en 3 fuentes de carbono, sin embargo, se evaluaron 8 relaciones C/N diferentes. Los resultados de esta prueba pueden ser observados en el Cuadro 23.

Cuadro 23. Resultado de las diferentes producciones de CMCasa variando la relación C/N (resultados en $\mu\text{mol}/\text{min ml}$).

F. de C.	Relación C/N			
	1	3	5	8
CMC	2.47E-03	-2.12E-03	9.69E-04	9.69E-04
R200	8.46E-03	3.61E-03	1.94E-03	-7.05E-04
OLT	3.53E-04	-7.93E-04	-1.76E-03	1.76E-04

De nuevo, los resultados pueden ser de difícil análisis si se ven únicamente como tablas, por lo que se optó nuevamente por una gráfica de barras (Figura 22) para un análisis de resultados más sencillo.

En la gráfica se observa claramente que el máximo de actividad se presenta, en todas las fuentes de carbono, en una relación C/N de 1. En este caso fue el rastrojo de maíz hidrolizado a 200 °C el mayor productor de enzima, seguido del CMC. Estos datos presentan cierta contradicción con los obtenidos en el experimento anterior, pues en aquel, el olote era de las fuentes de carbono que más estimulaban la producción de celulasas, mientras en este caso parece ser que su actividad se ve inhibida.

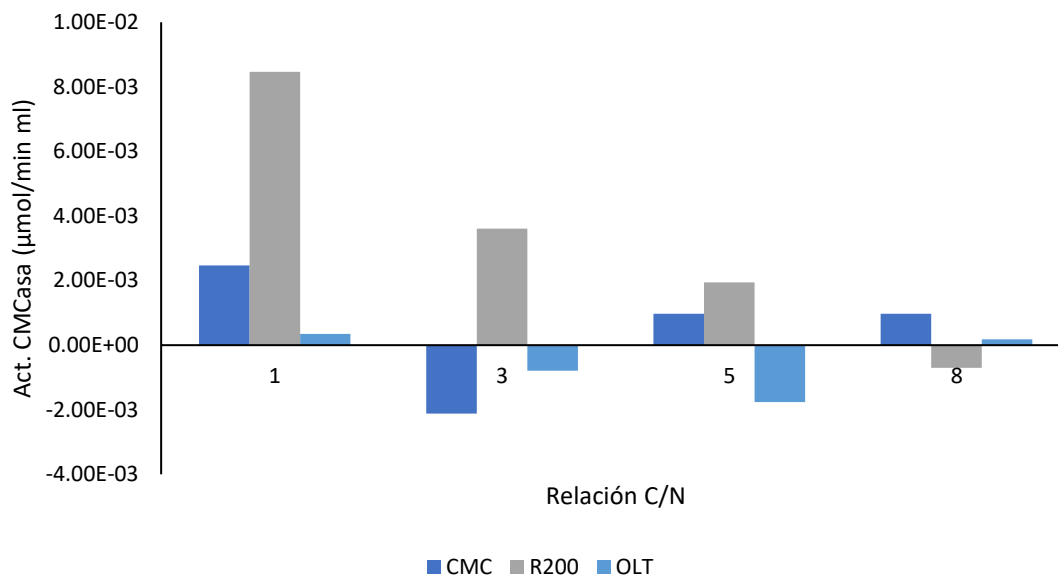


Figura 22. Gráfica de barras de las diferentes producciones de CM Casa a relaciones C/N variables.

3.3.3. Producción de CM Casa utilizando malta gastada como fuente de carbono en un BioBundle autoclaveable de 7 L

Este experimento buscó estimular a la bacteria a producir la mayor cantidad de enzima posible, se empleó la relación C/N más efectiva de acuerdo con experimento anterior y se implementaron condiciones de agitación y aireación para estimular aún más a la bacteria a producir celulasas. Posteriormente estas celulasas serán purificadas para su posterior análisis proteómico. En un primer análisis (en el que todavía no se concentran las proteínas) se encontró una actividad de 0.002 µmol/min ml, lo que no es muy diferente a las actividades que ha tenido en experimentos anteriores. Se espera que después de concentrarla, esta actividad vaya en aumento. Sin embargo, como conclusión preliminar, en realidad no hubo un incremento considerable en la actividad, por lo tanto, se deben experimentar nuevas formas de cultivo como lotes alimentados o cultivos continuos.

3.3.3. Producción de xilanasa a partir de un cultivo por lote, utilizando olote como fuente de carbono, empleando un biorreactor Frasco Schott de 1L

Se realizó un cultivo en duplicado utilizando el olote como fuente de carbono y se operó durante 72 h. Para la separación del primer reactor se intentó centrifugar las muestras a

4000 rpm, 4 °C y 10 min, sin embargo, este procedimiento se tuvo que repetir 3 veces más para lograr un extracto crudo enzimático clarificado. Para la réplica este procedimiento fue modificado y el extracto crudo se centrifugó solo una vez bajo las mismas condiciones, pero 60 min. Una vez obtenido el extracto se buscó medir la actividad xilanas. En una primera forma de abordar el problema de la escasez de xilano para la realización de la prueba, se optó por usar olote que está compuesto principalmente de este heteropolisacárido. El protocolo empleado fue el mismo descrito en la Figura 7, pero empleando olote en lugar de papel filtro. El resultado de esta prueba se reporta en la Figura 23.

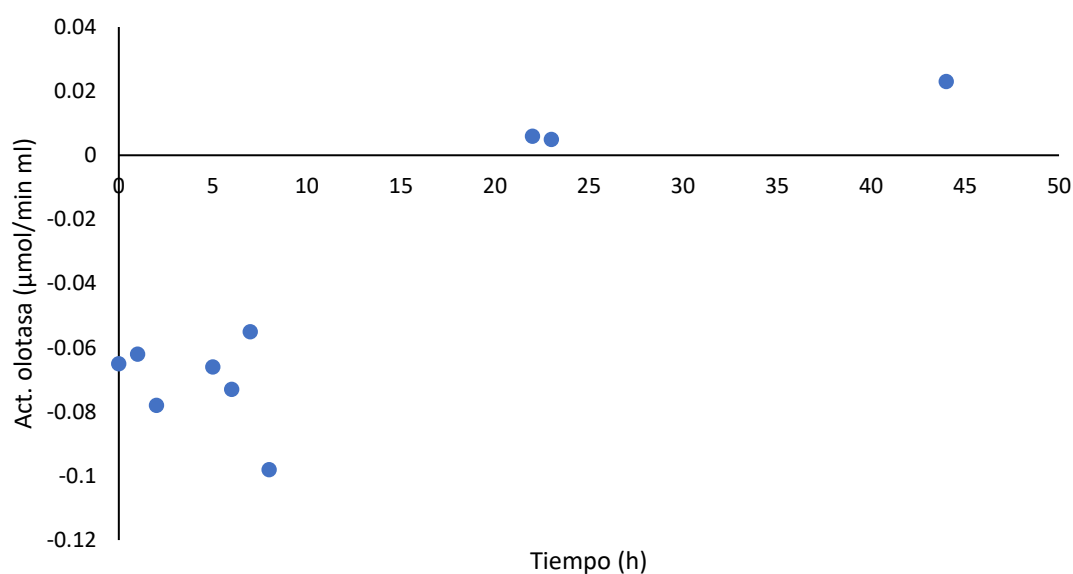


Figura 23. Determinación de la cinética de producción de olotasa.

Los resultados de esta medición no fueron favorables considerando que el olote tenía una alta presencia de azúcares reductores que colorearon el medio, por lo tanto, la prueba no es confiable. La forma de la gráfica parecería de una cinética normal, sin embargo, gran parte de los resultados están en el eje negativo, lo que representaría una actividad negativa y eso no es posible; las “actividades negativas” se pueden explicar porque la muestra, al estar saturada de azúcares no tiene un cambio notable en su absorbancia, por lo tanto, cualquier partícula suspendida puede generar cambios radicales en el valor de absorbancia, en este caso como el sustrato para la prueba de actividad enzimática fue olote pulverizado, al momento de centrifugarlo no sedimentaba por completo, por lo que hubieron interferencias al medir las muestras. Para solventar esto se consiguió la xilana en estado

puro y se preparó una solución de esta al 1%, con su propia metodología para medición de actividad. Utilizando este nuevo procedimiento se volvió a medir el desempeño de la enzima en la cinética donde el olote fue la fuente de carbono (Figura 24).

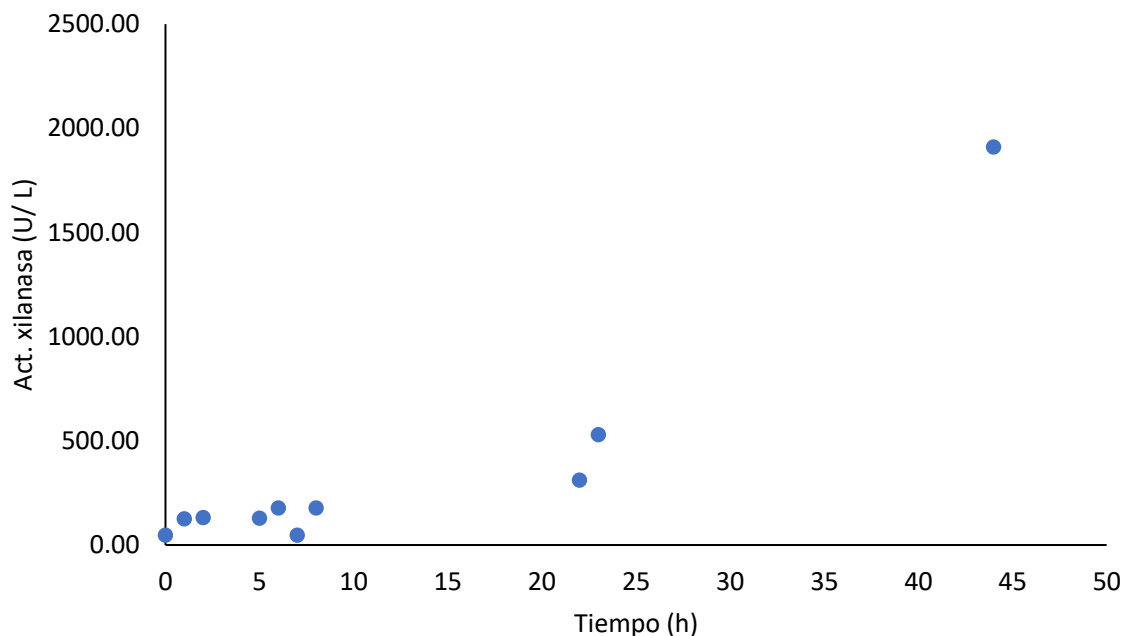


Figura 24. Determinación de la cinética de producción de xilanasas.

En este caso se encontró no sólo que hubo presencia de xilanasas, sino que su concentración en el medio aumentó conforme evolucionó la cinética de manera exponencial. Sin embargo, este crecimiento no se ajustó a ningún modelo cinético, posiblemente debido a que *Cellulomonas* no alcanzó el estado estacionario. Los experimentos posteriores se incubaron durante más tiempo para alcanzar este punto en el metabolismo.

Como se mencionó con anterioridad, no se analizaron los datos de las cinéticas utilizando glucosa y rastrojo hidrolizado a 150 °C por la falta de puntos que dificultarían el análisis.

3.3.4. Producción diferencial de xilanasas y biomasa bajo diferentes condiciones de cultivo (fuentes de carbono y relación C/N variables).

Los resultados obtenidos de biomasa y actividad enzimática se registraron en el Cuadro 24.

Cuadro 23. Resultado de las diferentes producciones de proteína soluble total (biomasa indirecta) y actividad xilanasas en diferentes tipos de sustrato y relaciones C/N.

Relación C/N (g/g)	Tipo de sustrato	Biomasa Celular (g/L)	Xilanasas (U/L)
10.00	Algodón	0.069	26.39
5.50	Glucosa	0.061	0.00
7.75	Olote	0.109	443.64
5.50	Rastrojo	0.078	344.36
7.75	Rastrojo	0.042	277.07
1.00	Rastrojo	0.078	197.25
10.00	Glucosa	0.058	0.00
10.00	Glucosa	0.017	0.00
5.50	Glicerol	0.068	681.13
1.00	Algodón	0.079	309.07
5.50	Algodón	0.033	189.00
3.25	Olote	0.092	195.27
1.00	Leche	0.084	268.82
5.50	Hojas	0.233	141.50
1.00	Glucosa	0.095	347.33
5.50	Olote	0.095	188.01
10.00	Leche	0.645	81.47
5.50	Leche	0.441	423.85
5.50	Algodón	0.093	162.61
1.00	Tela	0.055	103.57
10.00	Olote	1.206	121.05
5.50	Glicerol	0.288	463.43
1.00	Glucosa	0.012	264.54
1.00	Hojas	0.124	72.57
5.50	Leche	0.63	305.44
5.50	Hojas	0.184	569.97
5.50	Tela	0.102	327.54
10.00	Tela	0.109	501.70
10.00	Glicerol	0.05	497.41
5.50	Tela	0.032	303.79
7.75	Glicerol	0.023	152.39
10.00	Hojas	0.125	126.00
10.00	Rastrojo	0.052	312.03
10.00	Leche	0.58	1228.67
7.75	Hojas	0.165	142.82
5.50	Rastrojo	0.045	286.64
1.00	Rastrojo	0.142	498.40
5.50	Olote	0.006	152.06
5.50	Glucosa	0.027	0.00

1.00	Glicerol	0.074	679.81
10.00	Tela	0.061	368.44
10.00	Glicerol	0.111	601.64
1.00	Olote	0.085	1144.56
1.00	Algodón	0.171	205.82

Empleando el *software* Design-Expert se realizó una superficie de respuesta en la que se analizaron tanto la producción de biomasa como la de las xilanasas ante los diferentes factores de estrés: tipo de sustrato y relación C/N. En las Figuras 25-28 se muestran los diferentes gráficos de resultados en el que se comparan las variables de respuesta (biomasa y actividad enzimática) con los factores (tipo de sustrato y relación C/N).

En la Figura 25 se compara la biomasa producida por cada uno de los diferentes sustratos a diferentes relaciones C/N (eje horizontal). Se observa cómo el comportamiento en la mayoría es casi lineal con variaciones muy pequeñas, a excepción del caso del olote, en el que se tiene una diferencia de biomasa considerable a una relación C/N de 10 g/g comparada con las demás. En la Figura 26 se observa ahora la biomasa producida por cada tipo de sustrato (eje horizontal) de acuerdo con cada relación C/N. En este caso los resultados fluctuaron, pues, si bien en una relación de 1 parece ser que la biomasa no varió, en las demás relaciones se observan cambios considerables entre fuentes de carbono, principalmente se ven diferencias más pronunciados en el caso del olote y la leche.

De hecho, el factor significativo para la diferencia de biomasa es el tipo de sustrato ($P < 0.0001$), mientras que la relación C/N no demostró significancia estadística en la diferencia de los resultados. Esto indica que en futuros experimentos se tienen que comparar otros factores con el tipo de sustrato como puede ser la agitación, la aireación, la concentración del inóculo, etc.

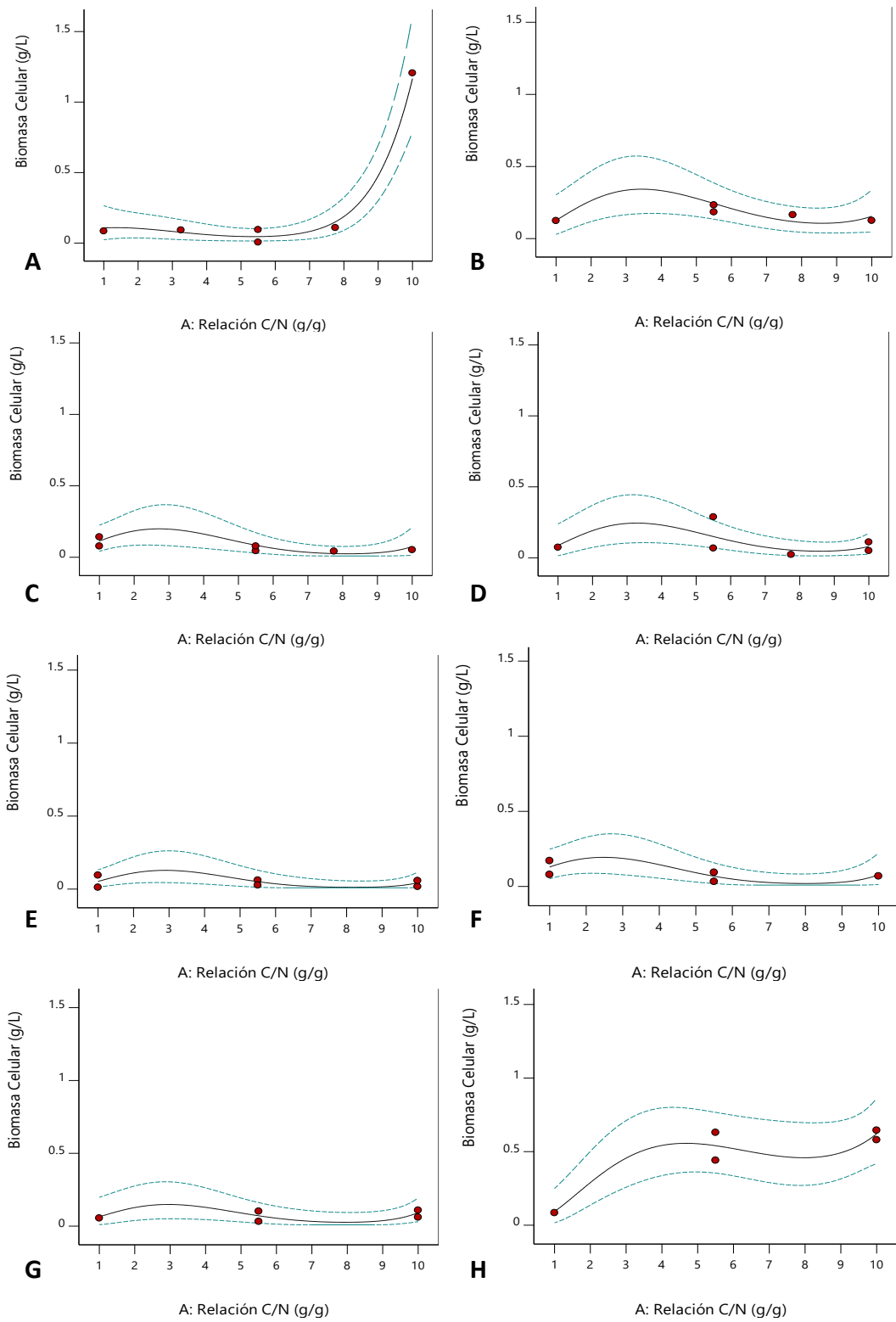


Figura 25. Cambio de concentración de biomasa por tipo de sustrato a diferentes relaciones C/N. A) olote, B) hojas secas, C) R150, D) glicerol, E) glucosa, F) algodón, G) tela, H) leche.

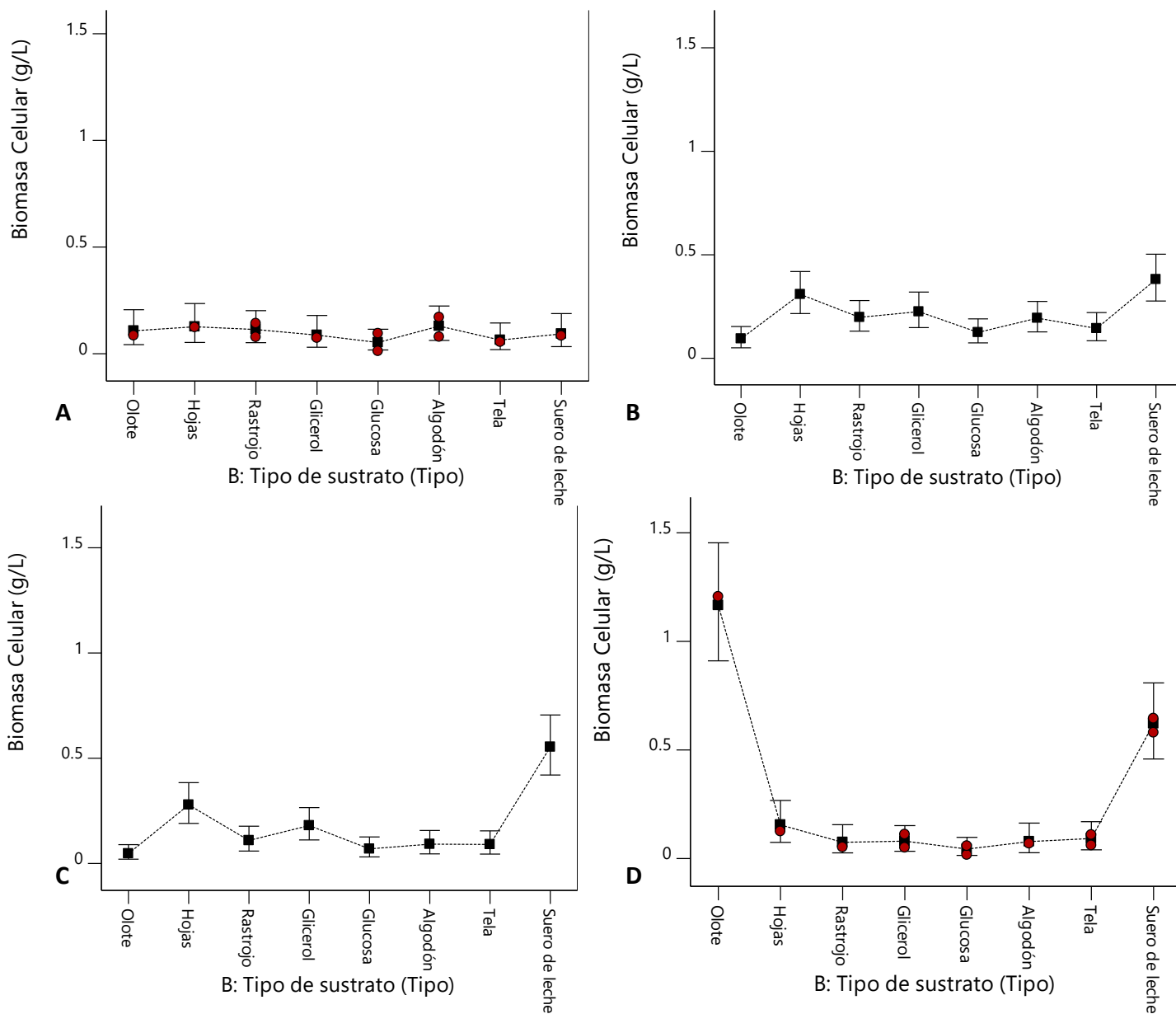


Figura 26. Cambio de concentración de biomasa por concentración C/N a diferentes sustratos. A) 1.0 g/g, B) 2.5 g/g, C) 5.0 g/g y D) 10.0 g/g.

Tal como en el caso anterior, las figuras 27 y 28 analizan la actividad xilanasa, primero en relación con cada tipo de sustrato y posteriormente por relación C/N. En un primer análisis visual de la figura 27 se pueden ver varios comportamientos casi lineales a excepción del olote, el glicerol y la tela. Lo que se podría repetir en la Figura 28 si no existieran desviaciones estándar tan altas. De nueva cuenta la relación C/N demostró no ser significativa ($P=0.0348$), mientras que el tipo de sustrato ($P<0.0001$) sí lo es.

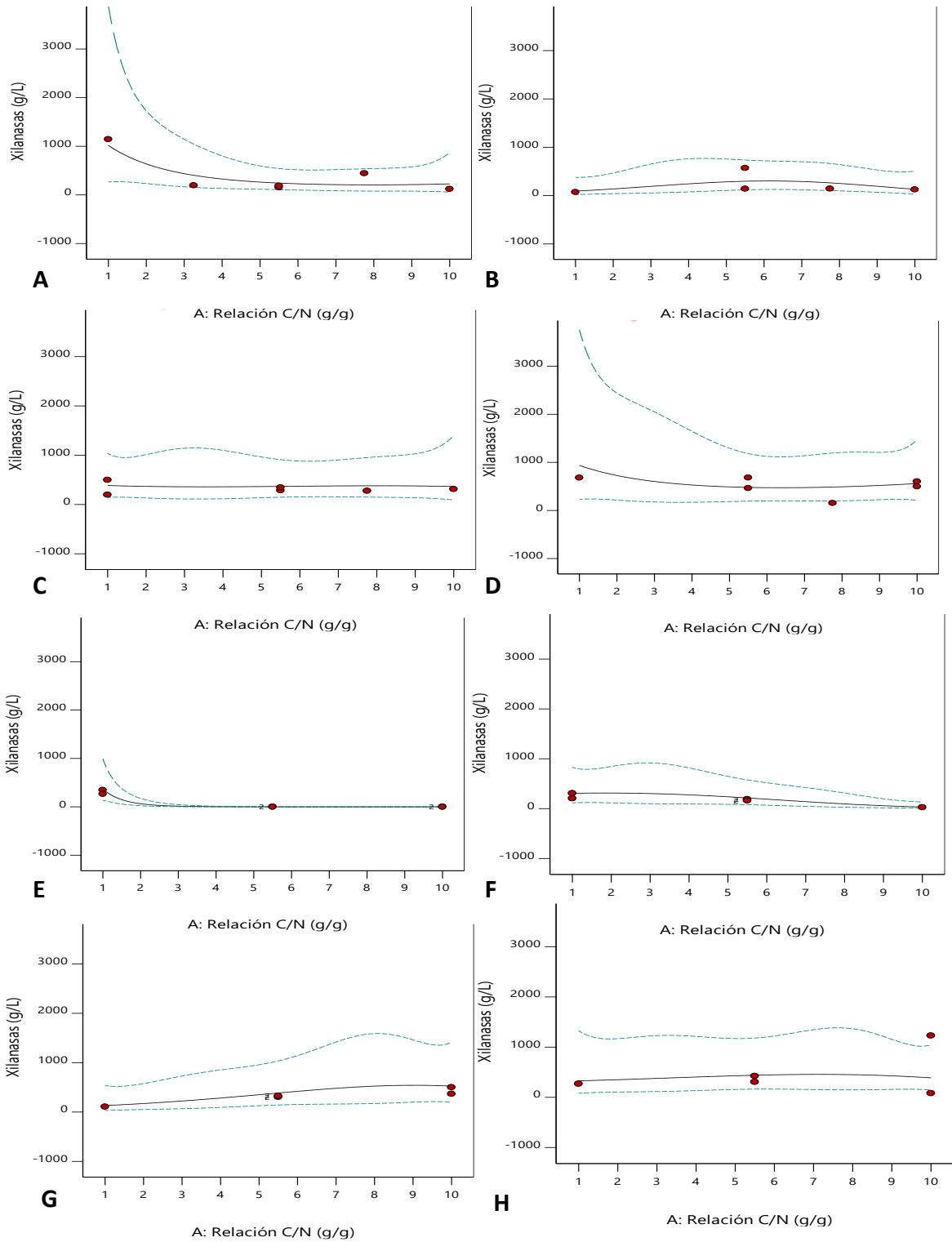


Figura 27. Cambio de concentración de xilanas por tipo de sustrato a diferentes relaciones C/N. A) olote, B) hojas secas, C) R150, D) glicerol, E) glucosa, F) algodón, G) tela, H) leche.

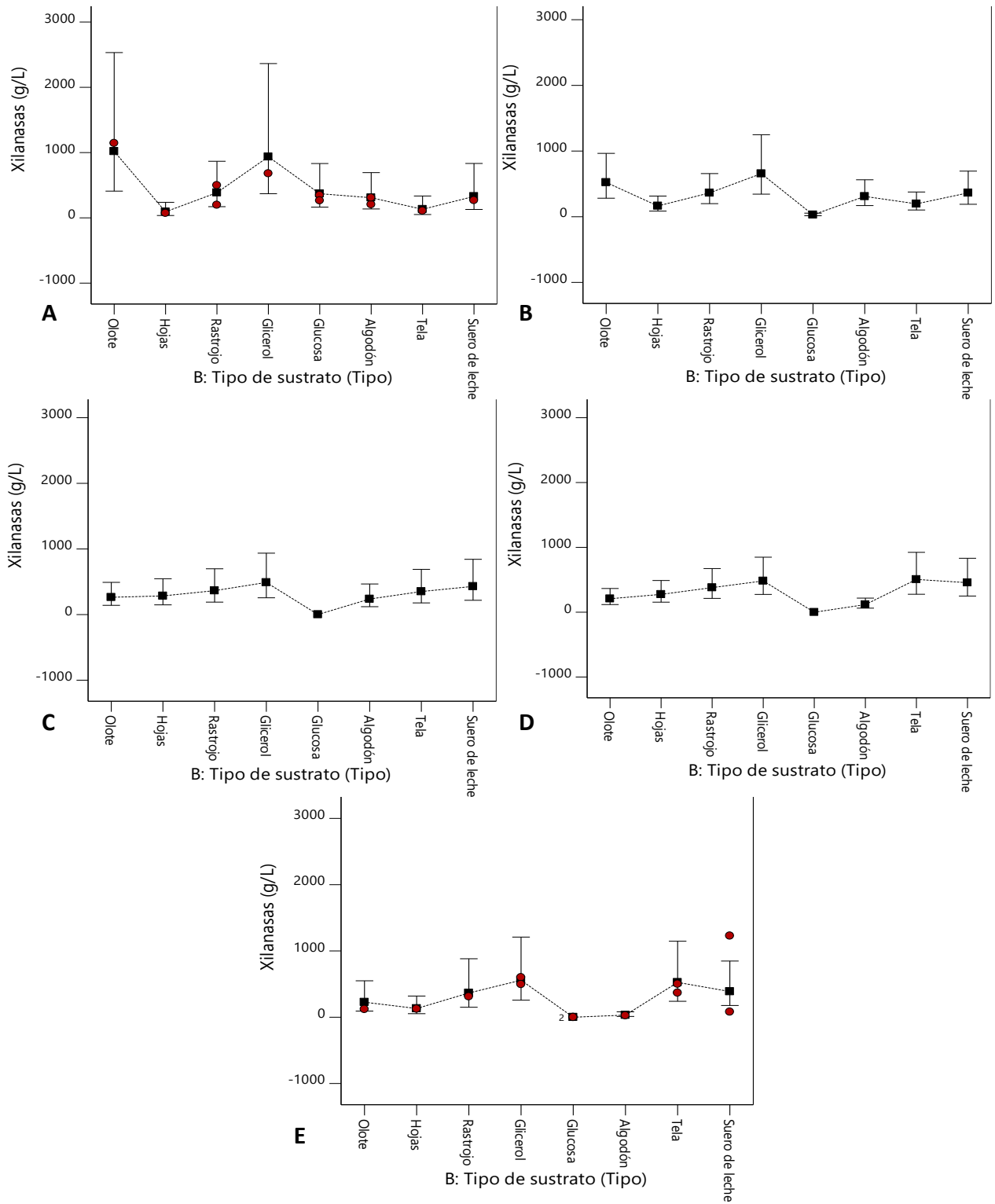


Figura 28. Cambio de concentración de xilanasas por concentración C/N a diferentes sustratos. A) 1.0 g/g, B) 2.5 g/g, C) 5.0 g/g, D) 7.5 g/g y E) 10 g/g.

Los resultados de este análisis fueron confiables al tener valores de R^2 de 0.9338 (variable biomasa) y 0.9020 (variable actividad xilanasas). Con ayuda de estos modelos de predicción el programa lanzó la condición que tiene los resultados más deseados, que puede tomarse como el valor óptimo dentro de este conjunto de resultados. Se encontró que con una deseabilidad del 97.8%, un medio con olote a una relación C/N de 10 g/g presenta los mejores resultados tanto de biomasa como de actividad.

Cabe destacar que ninguno de los sustratos (a excepción del R150) fue pretratado por lo que los resultados reflejan la capacidad bruta de *C. flavigena* de sobrevivir en medios adversos. Sustratos como el glicerol, por ejemplo, no permiten que la biomasa crezca adecuadamente, sin embargo, tiene de los rendimientos más altos de producción de xilanasas. Esto puede explicarse porque el glicerol al no ser un carbohidrato no es ni inductor ni represor del gen y la mutación de la cepa estimula la producción desregulada de xilanasas. En este caso particular, aunque poca biomasa produce muchas enzimas, si hubiera una mayor concentración celular esta podría incrementar la densidad enzimática, sin embargo, ese tendría que ser un experimento a futuro.

4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto

4.1. Aprendizajes profesionales

En este proyecto he desarrollado gran variedad de competencias, no sólo respecto a mi carrera, sino también personales. Profesionalmente este proyecto me ha ayudado a calendarizar actividades y mantener un control más riguroso sobre mi agenda. Además, los laboratorios son espacios colectivos, por lo que uno se tiene que adaptar a la situación del espacio en el momento de trabajar. Desarrollé habilidades para trabajar cumpliendo objetivos en tiempos específicos para poder generar el máximo de información en el menor tiempo posible. El seguimiento de protocolos fue primordial en este proyecto, pues su correcta puesta en práctica es lo que permite que los resultados salgan como deben. En cuanto a saberes multidisciplinares, desarrollé nuevas técnicas de búsqueda de información y redacción, lo que ayudó en la elaboración de este documento. El principal aprendizaje que me llevo con respecto a mi profesión es que la investigación no debe ser

tomada a la ligera e implica dedicación de tiempo completo si se quieren cumplir los objetivos, además, hay que tener paciencia, porque no todas las corridas experimentales van a dar los resultados esperados.

4.2. Aprendizajes sociales

El principal objetivo del proyecto es el aprovechamiento de residuos para la generación de productos de valor agregado, lo que, en pocas palabras es una forma de convertir algo que normalmente es considerado como basura en dinero. Finalmente, este proyecto es un prototipo para lo que en un futuro se puede volver una biorrefinería, el mayor ejemplo de economía circular que existe. Ayudar al ambiente implica ayudar al resto del mundo. Además, se apoya a la economía de quienes producen la biomasa residual, pues así no tienen que pagar grandes sumas de dinero en disponer de sus residuos o peor, pagar multas muy graves por una disposición incorrecta de los mismos. Si bien, mi proyecto no tiene efectos inmediatos, es una gran apuesta a futuro para prevenir el desgaste del suelo, la contaminación de grandes parcelas de tierra e incluso gastos innecesarios de dinero por parte de los productores. En realidad, mi idea de la sociedad no cambió, pues yo entré a este proyecto sabiendo su objetivo, lo que logró fue reafirmar mis ganas por hacer del proyecto una realidad en un futuro no tan lejano.

4.3. Aprendizajes éticos

La ciencia es un constante debate ético y ninguna decisión debe ser tomada a la ligera, es parte de la responsabilidad del científico llevar registros de lo que hace y dar a conocer a sus superiores cuando se equivoca. Las decisiones que tuve que tomar no fueron tan difíciles, consistieron principalmente en decidir si tenía que repetir un experimento o no, porque los resultados no fueron claros o por la contaminación. Es responsabilidad del científico reportar cosas replicables y, además, admitir cuando cometió un error, porque lo último que deseas al generar información es generar información equivocada. Mi profesión debe ser ejercida en pro del conocimiento y de transmitir lo que descubro o invento a los demás para que ellos puedan aplicarlo en lo que más les convenga.

4.4. Aprendizajes en lo personal

El PAP fue una gran experiencia para conocer el trabajo de un investigador, me dio la oportunidad de tomar decisiones por mi cuenta sobre lo que es mejor para mí y mi proyecto. Me dio experiencia que me hizo descubrir que puedo procesar grandes cantidades de información con facilidad como un buen investigador. En cuanto a la sociedad, la reconozco en cada paso del PAP porque mi proyecto es un obsequio para ella, es una oportunidad de ayudar a sanar lo que está roto: el ambiente. Lo que más me llevo es dedicación y que si quiero que algo salga como espero, debo poner todo mi empeño en ese proyecto.

7. Conclusiones

A manera de conclusión, se cumplieron parcialmente los objetivos del proyecto, se logró parte de la caracterización de *C. flavigena* PR-22 al poder observarla morfológicamente, evaluar qué medio de cultivo le favorece de acuerdo con las condiciones del medio (en este caso el uso de agua corriente y la concentración de cloruro de calcio en el medio). Se estudiaron ciertos flujos metabólicos al encontrar, por ejemplo, las fuentes de carbono con las que se producen más celulasas o la relación C/N que favorece la producción de estas incluso se logró hacer un diseño experimental en el que se demostró si esta última tenía un efecto realmente significativo en la producción enzimática (que no fue el caso), sin embargo, faltan varios aspectos a evaluar en ese tema, todavía falta ver el efecto del pH, la temperatura, el tipo de cultivo (por lote, lote alimentado o continuo), el efecto de la agitación y la aireación. Todo el sistema de genes. Que, tocando ese tema, la cepa se ha logrado mantener con las mismas características a lo largo del tiempo, todo gracias a la labor de conservación en la que se ha buscado mantener sus propiedades productivas de enzimas hidrolíticas. Para la culminación del proyecto o sus fases finales, hace falta mucho material, hay una gran crisis de escasez de equipo en el ITESO, por lo que propondría conseguir más herramientas de trabajo, para agilizar el trabajo y poder generar información de manera más eficiente e incluso con mayor precisión.

6. Bibliografía

- Alemán-Nava, G. C.-F.-C.-C. (2014). Renewable energy research progress in Mexico: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 140-153.
- Arimuya-Manamu, S. T.-P. (2014). *Obtención de etanol a partir del residuo lignocelulósico cervecero de la cervecería amazónica-Iquitos*. Iquitos-Perú: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.
- Barroso-Casillas, M. (2010). Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorefinería. *Universidad Politécnica de Madrid*.
- BOE. (2011). Boletín Oficial del Estado. Residuos y suelos contaminados. *Ley 22/2011*.
- Cajo-Guerrero, S. V.-R. (2017). Obtención de azúcares fermentables por hidrólisis enzimática a partir de los residuos de mango (*Mangifera indica* L.). *Universidad Señor de Sipán*.
- Chen, H. Q. (2010). Key technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Science Direct*.
- Cury, K. A. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 122-132.
- Cutter, E. (1986). *Anatomía vegetal Parte 1- Células y Tejidos*. Sao Paulo: Roca.
- Ferrer-Marcelo, Y. L.-R.-Á.-M.-O.-F.-C. (2011). Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales. *ICIDCA*, 3-12.
- Fuentes, J. M.-d. (2001). Análisis químico y digestibilidad "in vitro" de rastrojo de maíz. *Agronomía Mesoamericana*, 189-192.
- García, C. R. (2015). *Sustainable bioenergy options for Mexico: GHG mitigation and costs*. Morelia: Renewable and Sustainable Energy Review.
- García-Arellano, A. (2014). *Obtención de metabolitos de alto valor mediante un proceso tipo biorrefinería a partir de S. cerevisiae (Mayen Ex E. C. Hansen) generada como un subproducto del proceso cervecero*. San Nicolás de los Garza: Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Hahn-Hagerdal, B. G.-G. (2006). Bioethanol- the fuel of tomorrow from the residues of today. *Lund University*.
- Holt, J. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Jiménez-Bueno, N. X.-C.-H. (2011). Cellulomonas flavigena: clonación molecular del gen XIA que codifica para una xilanasas. *XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*.
- Jiménez-Duarte, A. S. (1984). Comportamiento del borrego pelibuey en crecimiento alimentado con dietas con base en rastrojo de maíz tratado con alcalis (NH₃, NaOH, UREA). *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 142-146.
- Martínez-Hernández, E. (2017). Biorefinerías a partir de productos y residuos agrícolas- Enfoque del nexo agua-energía-alimentos. *XXIX Reunión Científica, Tecnológica, Forestal y Agropecuaria*.
- Muñoz-Tlahuiz, F. G.-R.-M.-S.-T.-G.-G.-L.-R. (2013). Producción de rastrojo y grano de variedades locales de maíz en condiciones de temporal en los valles altos de Libres-Serdán, Puebla, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4(4).
- Robledo-Olivo, A. N.-A.-S. (2012). Uso del olote de maíz como sustrato microbiano para la obtención de xilanasas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(7).
- Rojas-Rejón, O. P.-V.-V.-J.-U.-M.-N. (2011). Production of cellulases and xylanases under catabolic repression conditions from mutant PR-22 of Cellulomonas flavigena. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 257-264.
- Sánchez-Gutiérrez, I. P.-N. (2013). El AMPc regula la producción de celulasas en Cellulomonas flavigena. *Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*.
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *UNAM*.
- Sun, Y. C. (2002). Hydrolysis for lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bio Resource Technology*.

Valdez-Vazquez, I. A.-B.-S. (2010). Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2147-2153.

Vázquez-Ramírez, D. H.-R.-N. (2011). Caracterización molecular del gen celcflA de *Cellulomonas flavigena*. *XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*.