

Aislamiento de cepas anaeróbicas termófilas productoras de celulasa y hemicelulasas implicadas en la producción de Bioetanol mediante técnicas de cultivo y aislamiento tradicionales y no tradicionales

**RIOS M. Neida,
CRESPO M. Carla F.,
TERRAZAS S. Luis E.,
ALVAREZ A. María T.**

*Área de Biotecnología -
Instituto de Investigaciones
Fármaco Bioquímicas,
Facultad de Ciencias
Farmacéuticas y Bioquímicas,*

*Avda. Saavedra 2224
Universidad Mayor de San
Andrés, La Paz, Bolivia*

*Autor para correspondencia:
neidarm@gmail.com*

Palabras Clave:

cultivo anaerobio, celulasas, hemicelulasas,
D-glucosidasas, bioetanol, inmovilización
de bacterias

Key words:

anaerobic culture, cellulases, hemicellulases,
D-glucosidases, bioethanol, immobilized
bacteria

RESUMEN

La problemática de los combustibles, su agotamiento y alto costo han incentivado a indagar sobre la obtención de energías alternativas como el biogás, biodiesel y bioetanol, a partir de la hidrólisis de residuos agroindustriales, contribuyendo de esta manera a la biorremediación.

En el presente estudio se cultivaron bacterias anaeróbicas termófilas aisladas de aguas termales de la región altiplánica de Bolivia, mediante la técnica de Hungate modificada, cultivo bifásico (métodos tradicionales) [1],[2] y encapsulación en alginato de calcio (método no tradicional)[3]. Dos cepas cultivadas en glucosa (2B) y xilosa (FT3) fueron seleccionadas. Las actividades enzimáticas celulolítica y xilanolítica de las cepas aisladas fueron 1 y 0.9 UI/mL, y la producción de bioetanol fue de 0.25 y 0.1 g/L, respectivamente. La inmovilización de las bacterias en perlas de alginato permite el incremento de la biomasa y mayor rendimiento de producción, facilitando el uso directo en la producción de etanol o en la purificación de enzimas de interés industrial.

ABSTRACT

The problem of fuels, their exhaustion and high cost have been considered enough reasons to investigate how to obtain an alternative energy source such as biogas, biodiesel and bioethanol, through the hydrolysis of agroindustrial residuals, contributing this way to the bioremediation.

In this study were cultivate and isolated anaerobic thermophilic bacteria isolated from thermal waters of Bolivian Andean region, using Hungate modified Technique, Biphasic culture (traditional methods) and Calcium Alginate Encapsulation (non traditional method). 2B and FT3 consortia were selected by cultivation in glucose and xylose respectively. Two enzymatic activities were measured in both consortia. The cellulolytic and xylanolytic activity of consortia were 1 and 0.9 UI/mL respectively. Ethanol production was 0.25 g/L and 0.1 g/L respectively. The immobilization of bacteria in alginate beads

allows the increment of biomass and high yield ethanol production. These facts facilitate the direct use in ethanol production or in purified enzymes of industrial interest.

INTRODUCCION

La diversidad microbiana es una fuente importante de productos y procesos biotecnológicos ^{1,2}. Sin embargo, los métodos tradicionales de cultivo de microorganismos han limitado el análisis a aquellos que son capaces de crecer en condiciones de laboratorio. Por tanto, uno de los retos más importantes de la microbiología y biotecnología actuales es el estudio de toda esta diversidad ^{3,4}.

Los procesos biotecnológicos se han enfocado en las propiedades y ventajas que pueden proporcionar los ambientes extremófilos, dado que son estos los que permiten llevar a cabo procesos industriales, aportando datos importantes tanto para la ciencia como para aquellas industrias que aplican estos procesos con fines lucrativos. Es así que las bacterias anaerobias constituyen el principal grupo de estudio para procesos, como la producción de enzimas de interés industrial y ahora compuestos que producen lo que se ha denominado bioenergía como el biogás, bioetanol, y biodiesel como una fuente alternativa ⁵.

Existe una gran demanda de productos y procesos biotecnológicos por ejemplo, los procesos catalizados por enzimas representan una alternativa a los procesos químicos convencionales, ya que se produce en menor número los subproductos, y además porque son procesos más selectivos hacia el producto de interés. La dependencia actual de productos derivados del petróleo, y la tendencia a la utilización de otras fuentes de carbono (menos contaminantes) para obtener energía y productos de interés farmacéutico, clínico y alimentario. Sin embargo, el desarrollo de nuevos productos y procesos está limitado a las enzimas ya conocidas, aproximadamente 4300 enzimas ya secuenciadas, de las cuales 300 están comercializadas ⁶.

Numerosas técnicas de cultivo han sido reportadas para el aislamiento de las bacterias anteriormente mencionadas, estos cultivos generalmente incluyen varios métodos como el método PRAS de Hungate ⁷, que es bastante utilizado y permite un exitoso aislamiento y cultivo, también se tiene el uso de Jarras Gaspack, bolsas plásticas, y la "Cámara de guantes". Los dos últimos métodos son muy caros, requieren equipamiento complejo, son lentos y se

usan para estudios de Flora Normal en laboratorios altamente especializados. Si bien estos métodos son efectivos, son muy laboriosos y requieren de mucho tiempo. Por otro lado, últimamente se ha demostrado que el uso del polímero Alginato de sodio ⁸, que nos permite aislar a células y moléculas por encapsulación, es así que esta técnica también se puede aplicar al aislamiento de bacterias viables no cultivables en un ambiente anaerobio dándonos al mismo tiempo la posibilidad de cultivarlos, obteniendo de esta manera colonias a partir de una única célula bacteriana.

Las enzimas celulíticas y hemicelulolíticas, tienen gran interés industrial principalmente las celulasas y xilanasas ya que tienen un importante rol en la reducción de compuestos clorados y dióxido de cloro en la industria del papel. La α -D-xilosidasa es uno de los componentes enzimáticos del complejo hemicelulítico, ampliamente distribuido en la naturaleza éste se emplea para la hidrólisis de componentes que interfieren en la producción de vino, por otro lado esta enzima tiene sinergismo tanto con las xilanasas y como las glucosidasas; es así que representan un potencial aplicación en el procesamiento de alimentos, y la producción de biocombustibles ⁹.

En este estudio se aislaron cepas, de consorcios que tienen actividad enzimática y además producen etanol, para el aislamiento se utilizaron tres métodos: la Técnica de cultivo en tubos roller y la técnica de cultivo bifásico (tradicionales), estos resultaron eficaces para el aislamiento de cepas, y la Técnica de Encapsulamiento en perlas de alginato cálcico (no tradicional), a través de este método se pudieron aislar cepas productoras de celulasas y hemielulasas, y etanol, con valores bastante altos en comparación con los anteriores métodos, es así que este método representa un potencial recurso para la el aislamiento y cultivo de bacterias anaerobias termófilas.

MATERIALES Y METODOS

Toma de muestras y condiciones de cultivo

Muestras de agua, lodo y tierra en la que se observe materia orgánica en descomposición fueron recolectadas de ambientes geotérmicos de la región altiplánica de Bolivia, cuya condición climática es extrema.

Las muestras fueron cultivadas en viales de 100 mL a una temperatura de 60° C y pH neutro en un medio basal mineral que contiene Solución 1 10ml/L (g/

**Bienvenidos a un nuevo mundo,
el mundo de Laboratorios COFAR S.A.**



*La salud es para nosotros
el valor mismo de la vida.*

*Garantizamos productos con
los más altos estándares
de calidad.*



Comprometidos por una Vida con Salud.

www.cofar.com.bo

L): 100 NH_4Cl ; 10 NaCl , 10 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 200 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; Solución 2 1mL/L (g/L): 1.5 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.006 H_3BO_3 , 6.5 mL HCl 25%, 0,12 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 25 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 70 ZnCl_2 , 0,0015 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0003 Na_2SeO_3 , 0,5 NaOH ; Solución 3 30 mL/L (g/L): 85 NaHCO_3 ; el medio fue suplementado con solución de Vitaminas 10mL/L (Biotina 1 mg, PABA 5 mg, B12 5 mg, Tiamina 10 mg, csp 1000 mL), como agente reductor se utilizó sulfuro de sodio (10 % solución), 2 mL/L 10; y como fuente de carbono (10 - 20 %) se utilizaron residuos agroindustriales como ser paja de trigo y melaza de caña. El volumen del inoculo fue del 10% del medio de cultivo. En una primera etapa la fuente de carbono fue paja de trigo y melaza de caña.

Una vez seleccionados aquellos consorcios capaces de hidrolizar la paja de trigo y/o melaza se cultivaron en medios más específicos que contenían glucosa 0,5 % y xilosa 0,5 % como fuente de carbono en el mismo medio basal mineral.

Para crear un ambiente de anaerobiosis, el aire existente en los viales fue remplazado por gas nitrógeno antes de la inoculación. El crecimiento del cultivo fue detectado a través de la medición de la densidad óptica utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Cultivo y aislamiento de cepas

Técnica de Cultivo sólido en Tubos Roller

Consiste en una modificación de la Técnica de Hungate para anaerobios, para solidificar el medio se agrega 3 g/l de agar-agar, el medio se dispersa en las paredes de las botellas hasta que solidifique, sobre este crecen colonias que después son aisladas usando asas estériles. Este procedimiento se repitió hasta obtener un solo tipo de colonia ¹.

Cultivo Bifásico

El cultivo bifásico es usualmente utilizado para hemocultivos. Se caracteriza por tener dos fases, sólida y líquida. En la fase líquida se establece el enriquecimiento del inoculo hasta observar un aspecto lechoso. Luego de este tiempo, las botellas se incubaron de forma horizontal permitiendo la inoculación en la fase sólida para el desarrollo posterior de colonias individuales. Una vez desarrolladas las colonias estas fueron aisladas con asas estériles y repicadas en medio líquido en un ambiente anaeróbico (cámara de anaerobiosis).

Encapsulación en perlas de alginato

Esta técnica fue desarrollada como una forma alternativa para la recuperación de bacterias anaerobias viables no cultivables. La principal ventaja de esta técnica es que nos permite aislar una especie bacteriana en cada perla de alginato, la cual luego puede ser cultivable. La técnica consiste principalmente en mezclar 1 mL de alginato de sodio 1,5 % con 0.1 mL de la muestra previamente diluida. La suspensión-mezcla fue dispersada mediante goteo con jeringa 27G en una solución de cloruro de calcio 1,5 % en constante agitación para permitir la formación de las perlas ². Una vez polimerizadas, las perlas se trasladaron cada una a medio líquido con una fuente de carbono adecuada para su desarrollo.

Determinaciones analíticas

Determinación de la actividad enzimática

Determinación de celulasas y xilanasas por la técnica de DNS (Jirovetz y Bucchaver): El método de DNS es utilizado para la determinación de endocelulasas y endoxilanasas y esta basado fundamentalmente en la determinación de presencia de grupos carbonilos libres (C=O), de los llamados azúcares reductores. Se basa en la utilización de ácido 3,5-dinitrosalicílico para producir la oxidación de los azúcares ³.

Determinación de α -D-glucosidasa y α -D-xilosidasa (Therese Hansson): Este método determina las exocelulasas y exoxilanasas y principalmente se define como: la unidad enzimática α -D-glucosidasa y α -D-xilosidasa es expresada como la capacidad de liberar un μ mol de p-nitrofenol por minuto bajo condiciones estandarizadas ³.

La producción enzimática se realizó en medio líquido con fuentes de carbono específico para ambos casos.

Determinación de proteínas totales

La determinación de proteínas se realizó según la técnica de Lowry (1999), usando albúmina sérica bovina como estándar ¹¹.

Determinación de la producción de etanol

La determinación de etanol se realizó en la fase gaseosa mediante Cromatógrafo de Gases Clarus 500, se utilizó la columna Elite 1, el horno a una temperatura de 80°C, la temperatura de inyección a 200°C, se usó el detector FID a una temperatura de 250°C (Alvarez *et al.* 2006).

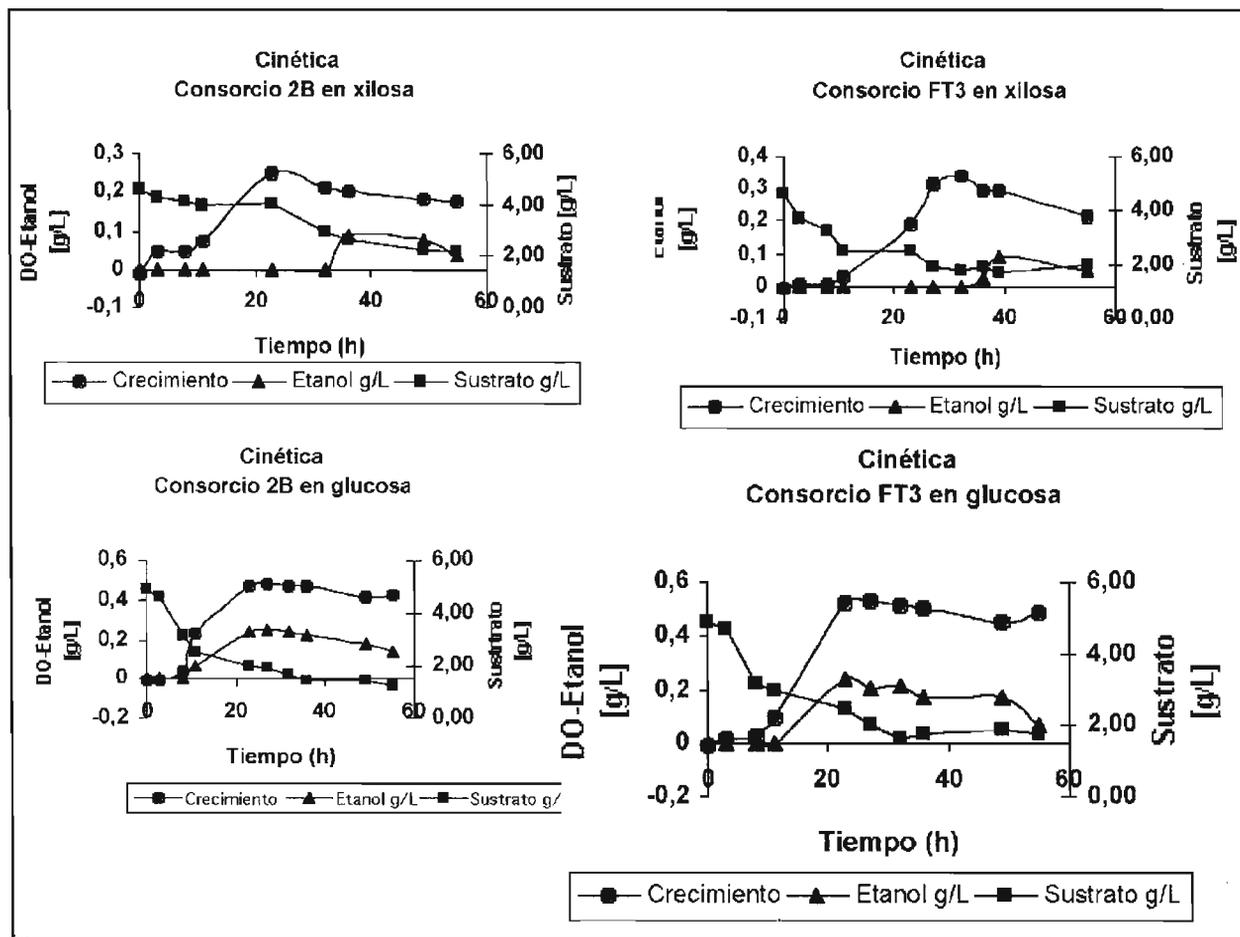
TABLA No. 1

MUESTRAS DE CONSORCIOS TERMÓFILOS SELECCIONADOS DE ACUERDO A SU PRODUCCIÓN DE ETANOL Y ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

MUESTRA	ORIGEN	SUSTRATO	Etanol g/L	Act. Celulolítica mUI/L	Act. Xilanolítica mUI/L
A 10	Laguna Chalviri	Paja de trigo	0,01	90	470
Lsc	Sol de mañana	Paja de trigo	0,012	80	450
4K	Aguas Termales Viscachani	Melaza	0,008	460	100
A10	Laguna Chalviri	Melaza	0,025	540	-
2B	Aguas Termales Capachos	Melaza	0,049	1030	-
Lsc	Sol de mañana	Melaza	0,031	391	-
Ft3	Aguas termales Potosí	Paja	0.049	1125	560

FIGURA No. 1

CINÉTICA DE CONSORCIOS SELECCIONADOS REPICADOS EN MEDIOS ESPECIFICOS : A) CONSORCIO 2B EN GLUCOSA, B) CONSORCIO FT3 EN, C) CONSORCIO 2B EN XILOSA, D) CONSORCIO FT3 EN XILOSA; CRECIMIENTO (●) CONSUMO DE SUSTRATO EN G/L (■), Y PRODUCCIÓN DE ETANOL EN G/L (▲).



RESULTADOS Y DISCUSION

Primera fase: selección primaria

Se seleccionaron aquellos consorcios que tenían la capacidad de degradar la paja de trigo y/o melaza de caña, y que demostraron actividad enzimática endocelulasa y endoxilanasas, además de ello se tomo en cuenta la producción de etanol de forma cualitativa Tabla No. 1.

Algunos estudios han demostrado que consorcios extremófilos son capaces de hidrolizar materia cruda, así mismo si bien estos dan valores altos de actividad enzimática y de producción de etanol, éste se ve inhibido por metabolitos secundarios principalmente ácidos grasos volátiles, que desvían la ruta metabólica hasta la producción final de metano¹²; en este estudio los consorcios seleccionados si bien no mostraron una alta actividad enzimática y de producción de etanol, no mostraron la presencia de ácidos volátiles.

Para una mejor selección éstos fueron cultivados en medios más específicos como la glucosa y xilosa de los cuales se seleccionaron dos consorcios. El consorcio 2B en glucosa mostró una producción de etanol de 0,25 g/L alcanzado a las 24 horas, así también el consorcio FT3 dio una producción de 0,2 g/L en glucosa Figura No. 1, estos consorcios mostraron mayor producción de etanol cuando la fuente de carbono es glucosa, en comparación a aquellos crecidos en xilosa.

FIGURA No. 2
CINÉTICA DE CEPAS ASILADAS MEDIANTE CULTIVO BIFÁSICO CEPA FT3 XILOSA 2B: CRECIMIENTO (●), CONSUMO DE SUSTRATO EN G/L (■), Y PRODUCCIÓN DE ETANOL EN G/L (▲).

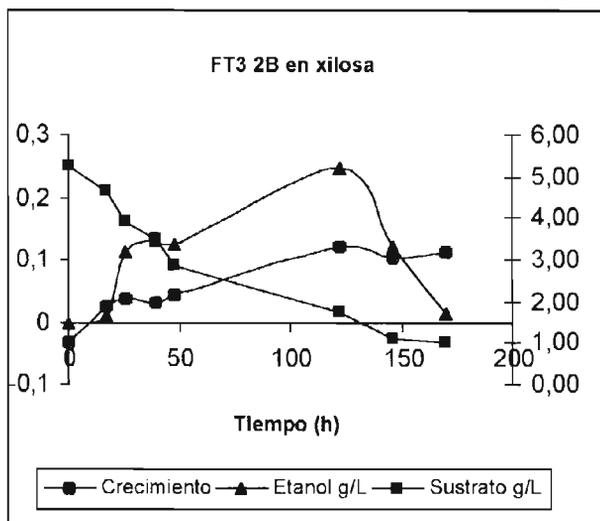
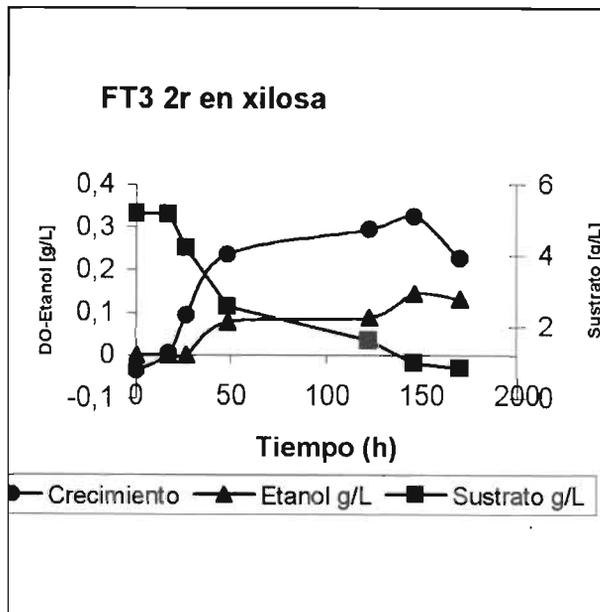


FIGURA No. 3
CINÉTICA DE CEPAS ASILADAS MEDIANTE TÉCNICA EN TUBOS ROLLER FT3 XILOSA 1R: CRECIMIENTO (●), CONSUMO DE SUSTRATO EN G/L (■), Y PRODUCCIÓN DE ETANOL EN G/L (▲).



Aislamiento de cepas

Cultivo bifásico

Se aislaron 8 cepas de las cuales se seleccionaron aquellas que mostraron producción de etanol Figura No. 2. La producción de etanol más alta fue de 0,25 g/L alcanzada a las 50 horas. La ventaja de este método es que permite un robustecimiento del inoculo primero en su fase líquida, para luego se puedan desarrollar colonias en su fase sólida.

Técnica en Tubos Roller

Se aislaron 10 cepas de las cuales se seleccionaron aquellas que mostraron producción de etanol Figura No. 3. la producción de etanol más alta fue de 0.21 g/L alcanzada a las 120 horas.

Este método permite el desarrollo de las colonias de forma atrapada en el agar-agar asegurando de alguna forma las condiciones de anaerobiosis, sin embargo dado que la muestra es mezclada con el agar-agar a una temperatura muy alta las bacterias pueden sufrir lesiones o morir.

Encapsulación en perlas de alginato

El encapsulamiento de células hoy en día es una técnica bastante utilizada ya que esta puede permitir

un mayor desarrollo de biomasa, una de las razones es que confiere protección a las células, por ejemplo en tratamientos para la remoción durante la biodegradación de gasolina o petróleo ¹³, por otro lado al incrementar la biomasa se incrementa la producción enzimática, comparada con un cultivo de células libres en suspensión, el cultivo encapsulado incrementa hasta dos veces más la producción¹⁴

En este estudio se aislaron 22 cepas del consorcio FT3 en xilosa, la inmovilización de las células mostró mayor producción de 0,73 g/L de etanol Tabla No. 2; triplicando los valores conseguidos, mediante las Técnicas de cultivo bifásico y la Técnica en Tubos Roller, técnicas tradicionales de aislamiento para anaerobios estrictos.

CONCLUSIÓN

Existen varias razones para conducir la búsqueda organismos con un crecimiento a altas temperaturas que al parecer son insignificantes en la ecología básica microbiana, el estudio de estos nos puede llevar a el descubrimiento de taxonomías interesantes poco comunes, y así también nos brindan datos interesantes sobre la evolución microbiana, además las aplicaciones usuales para la enzimología industrial. En nuestro país existen bastas regiones con dichas características por lo que es necesario llevara acabo este tipo de estudios.

El uso del bioetanol como energía alternativa, seguramente puede mejorar los ingresos de los productores de agroindustrias, además crear nuevos puestos de empleo en el campo, ya que los residuos agrícolas representan más del 20% de la producción total estos al ser utilizados no representaría una perdida para los productores.

El aislamiento y cultivo por inmovilización de células es en la actualidad una de las técnicas más atrayentes debido a que se puede incrementar la concentración de biomasa y por lo tanto incrementar

**TABLA No. 2
 CEPAS AISLADAS DEL CONSORCIO FT3 EN
 MEDIO BASAL CON XILOSA (0.5 G/L)**

Cepa	Etanol g/L	Cepa	Etanol g/L
1	0,03	12	0,23
2	0,10	13	0,00
3	0,05	14	0,20
4	0,23	15	0,06
5	0,73	16	0,00
6	0,16	17	0,08
7	0,00	18	0,01
8	0,17	19	0,00
9	0,28	20	0,00
10	0,10	21	0,08
11	0,01	22	0,00

www.corimex.com

CORIMEX LTDA.

Exactitud y precisión en el trabajo exigen productos de calidad

BINDER

eppendorf
In touch with life

ken-a-vision
KNOWLEDGE THROUGH VISION

MERCK

METTLER TOLEDO

Whatman

OFICINA COCHABAMBA
Calle Ismael Céspedes 1138
Tel: (4) 4422201-4422203
Fax: (4) 4422207
Casilla 708

OFICINA LA PAZ
Calle Montevideo 130
Tel: (2) 2440330
Fax: (2) 2440230
Casilla 359

OFICINA SANTA CRUZ
Av. Santa Cruz 1143
Tel: (3) 3333533
Fax: (3) 3331193
Casilla 2975

la productividad. La separación de productos de células inmovilizadas es más fácil comparada con sistema de suspensión de células; además la inmovilización de células puede permitir un proceso continuo de cultivación y aislamiento, por otra parte también la inmovilización es una estrategia de protección de las células, existen diferentes técnicas para inmovilizar células se puede usar polisacáridos o atrapamiento en distintos geles.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen especialmente el soporte económico recibido de ASDI/SAREC – Suecia en el desarrollo del Proyecto Biodiversidad Microbiana del Lago Poopo y Río Desaguadero.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. A. L. Demain and D. A. Salomon Anaerobic Fermentation. Manual of Industrial Microbiology, Washington D. C. , 1987;84-96.
2. Kulasingam Thayaananthan Cultivating the uncultured: amyolytic microorganisms from ecological niches. 2005
3. Therese Hansson and Patrick Adlercreutz Optimization of Galactoligosaccharide production from lactose using B-glycosidases from Hyperthermophiles. Food Biotechnology ,2001, 2:15
4. Organisation for Economic cooperation and Development Biotechnology for clean Industrial Products and processes,1998
5. P. L. Rogers et al. Application of Biotechnology to Industrial Sustainability. Trans IChemE, Part B, Process Safety and Environmental Protection; 2005, 83: 499-503.
6. Manuel Ferrer, Metagenoma: acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables. 2005
7. J. Wiegel Ga novel microorganisms from the Microbial observatory uzon caldera in Kamchatka, Russia extremophiles 2004. 5th International Conference on Extremophiles. September 19 -23, 2004Cambridge Maryland.
8. Smidsrod, O. y Skjak Brack Aginate as an inmolization matrix for cells. Trends in Biotechnology, 1990, 8(3):71-78.
9. M.I. Rajoka Kinetic parameters and thermodynamic values of b-xylosidase production by Kluyveromyces marxianus, Bioresource Technology; 2007, 98:2212-2219.
10. P. Sommer, T. Georgieva and B.K. Ahring Potential for using thermophilic anaerobic bacteria for bioethanol production from hemicellulose Biochemical Society Transactions 32, part 2, 2004
11. Manual de procedimientos. Universidad de Buenos Aires. Laboratorio de Micología Experimental; 1999.
12. N. V. Zybavreva, E. P. Isakova, and V. V. Biryukov. Conditions for Ethanol Production during Bioconversion of Cellulose-Containing Raw Material. Applied Biochemistry and Microbiology; 2001, 37:5.
13. Ricardo Yabur, Yoav Bashan, y Gustavo Hernández-Carmona Alginate from the macroalgae Sargassum sinicola as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. J Appl Phycol; 2007, 19:43-53.
14. Usama Beshay Production of alkaline protease by Teredinobacter turnirae cells immobilized in Ca-alginate beads. African Journal of Biotechnology; 20032(3):60-65,



LABORATORIO "SALAZAR"
ANALISIS CLINICOS
Y CITOPATOLOGIA
Dr. Germán Salazar López
BIOQUIMICO

Calle Batallón Colorados Nº 24 • Edificio "El Condor"
Piso 9 - Oficina 906 • Teléfono 2441754
Domicilio: Av. Ecuador Nº 2014 • Teléfono 2424497
La Paz - Bolivia