

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

**Revisión sistemática de la literatura sobre la producción bacteriana de celulasas
para degradar material lignocelulósico**

Sharoom Colombia Hernández Salamanca y Silvia Marcela Rodríguez Cuadros

Trabajo de grado para optar el título de ingeniero químico

Directora

Viviana Sánchez Torres

Ingeniera Química, Ph. D.

Codirectora

María Angélica Angarita Rangel

Ingeniera Química, M.Sc.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Programa de Ingeniería Química

Bucaramanga

2023

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Dedicatoria

Desde lo más profundo de mi corazón dedico este proyecto de grado a mi madre, Maria Luisa Salamanca, cuyo sacrificio y esfuerzos por sacarme adelante han sido invaluable. Este logro es más suyo que mío, por haber hecho la labor de padre y madre cuidando de formarme con buenos sentimientos y valores, por darme el ejemplo de no rendirme ante ninguna adversidad, por haber puesto toda su confianza en mí, por sus palabras de aliento en los momentos críticos y por todo su amor y paciencia para conmigo.

-Sharoom Colombia Hernandez Salamanca

Dedico este proyecto a mi mamá, Sonia Cuadros Suarez, por su apoyo incondicional, por ser mi mayor motivación, mi eje a seguir, mi madre y padre, por su lucha incansable en convertirme una profesional íntegra a pesar de los obstáculos, por sembrar en mí el deseo de superación, persistencia y responsabilidad que tanto la identifica y que tanto admiro de ella.

A mi sobrino, por ser el hermano que nunca tuve, por acompañarme en momentos de frustración, por las risas y palabras de motivación sinceras, por tener siempre el comentario acorde, en el momento preciso.

Y finalmente a mi abuelita, por su comprensión y ternura, por enseñarme el valor de ser siempre un buen ser humano para convertirme en un excelente profesional.

-Silvia Marcela Rodríguez Cuadros

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Agradecimientos

A todos los profesores que nos formaron a lo largo de esta experiencia universitaria, gracias por sus enseñanzas, su apoyo y su deseo de transmitirnos conocimiento y convertirnos en profesionales éticos; en especial gracias a la profesora Viviana Sánchez Torres por su paciencia y orientación en todo este proceso de elaboración del proyecto de grado.

-Sharoom y Silvia

A mis hermanitos, Lulu, Cami y Faber, quienes han sido los mejores amigos que me pudo dar la vida, quienes se han ganado todo mi respeto y admiración y quienes buscan darme los consejos más certeros para hacer mi vida más amena.

A mis sobrinitas, Lauren, Sofia y María Isabel, quienes me demostraron siempre su admiración, motivándome cada día para no rendirme y lograr mis objetivos.

A Juana, mi amiga fiel, por su compañía en las largas noches realizando este proyecto de grado.

A mis amigos del colegio y universidad, por siempre mostrar su confianza y creer en mis capacidades, sus palabras de aliento y apoyo siempre han sido pieza fundamental en mi desarrollo.

A Silvia, mi compañera de proyecto de grado, por toda la paciencia y disposición puesta para finalizar este proyecto de grado. Por tener siempre la mejor actitud a pesar de todas las dificultades que se nos presentaron en el camino.

Gracias a todos por tanto amor, sin ustedes esto no sería posible.

- *Sharoom Colombia Hernández Salamanca*

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

A mis amigos de la carrera, por los días, tardes y noches que pasamos en el centro de estudios, por las risas y los chismes, por los paseos dentro de la U, por los planes imposibles de concretar, por los almuerzos donde Doña Gloria y las siestas en casa de Mario antes de fenómenos.

En especial a mis mejores amigos Fabiana y Harvey, por su incondicionalidad, por su escucha, sus consejos sinceros y compañía en momentos de dificultad.

A Sharoom por su paciencia en todo este proyecto de grado, por su espera a pesar de las prácticas y el trabajo y su persistencia para darle finalización a esta etapa.

-Silvia Marcela Rodríguez Cuadros

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Tabla de contenido

	Pág
Introducción	12
1. Objetivos	14
1.1 Objetivo general	14
1.2 Objetivos específicos	14
2. Marco conceptual	14
2.1. Material lignocelulósico	14
2.2. Degradación de celulosa por hidrólisis enzimática	15
2.3. Celulasas	15
2.3.1. Endoglucanasa	16
2.3.2. Exoglucanasa	16
2.3.3. β -glucosidasa	16
3. Metodología	17
3.1. Búsqueda bibliográfica	19
3.1.1. Filtrado de documentos y criterios de selección	19
3.1.2. Extracción de datos	20
3.2. FASE 2: Evaluación de actividad enzimática y técnicas de purificación	21
3.3. FASE 3: Elaboración de una revisión sistemática de aplicaciones de celulasas en la industria	21

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

4. Resultados	22
4.1. Búsqueda bibliográfica	22
4.2. Proceso de filtrado y selección de documentos	22
4.3. Bacterias productoras de celulasas	27
4.3.1. Crecimiento bacteriano	28
4.3.1.1. Medio de cultivo	28
4.3.1.2. Fuente de carbono	30
4.3.1.3. Fuente de nitrógeno	30
4.4. Tipos de celulasa	31
4.4.2. Pruebas de screening	33
4.4.3. Ensayo de actividad enzimática	33
4.4.3.1. Ensayo cuantitativo de actividad enzimática celulasa	33
4.4.3.2. Condiciones óptimas para la actividad enzimática de las celulasas	36
4.5. Purificación de las celulasas	44
4.6. Aplicaciones	45
5. Conclusiones	47
Referencias	48
Apéndices	60

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Búsqueda inicial.....	22
Tabla 2. Medios de cultivo para el crecimiento de bacterias celulolíticas.....	29
Tabla 3. Porcentaje de artículos que realizaron ensayos de actividad enzimática.....	34
Tabla 4. Efecto del sustrato en la producción de celulasas para Bacillus Lichenformis ..	36
Tabla 5. Efecto de la fuente de nitrógeno en la actividad enzimática celulasa.....	38
Tabla 6. Efectos de la temperatura en la actividad enzimática celulasa	39
Tabla 7. Efectos del pH sobre la actividad enzimática celulasa.	40
Tabla 8. Efectos de la salinidad en la actividad enzimática celulasa.....	41

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Degradación de celulosa por endoglucanasas, exoglucanasas y β - glucosidasa	17
Figura 2. Etapas desarrolladas a lo largo de la metodología.....	17
Figura 3. Esquema global de la filtración y selección de documentos	24
Figura 4. Tipo de artículos encontrados en la investigación.....	25
Figura 5. Artículos por año de publicación.....	25
Figura 6. Artículos publicados por países.....	27
Figura 7. Metodología para la cuantificación de actividad enzimática de celulasas	35
Figura 8. Efecto del pH sobre la actividad endoglucanasa.	39
Figura 9. Aplicaciones de las celulasas en la industria.....	46

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Lista de apéndices

	Pág.
Apéndice A. Tablas de frecuencia para las condiciones de crecimiento bacteriano	60
Apéndice B. Métodos cualitativos para identificar actividad enzimática.....	62
Apéndice C. Métodos de cuantificación de azúcares reductores	63
Apéndice D. Preparación de reactivos Somogyi y Nelson	66
Apéndice E. Tablas de frecuencia para ensayos de actividad enzimática	67
Apéndice F. Valores de actividad enzimática en ensayos de celulasas teniendo en cuenta condiciones de sustrato, temperatura y pH.	68
Apéndice G. Aplicaciones industriales de enzimas celulasas.....	71

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Resumen

Título: Revisión sistemática de la literatura sobre la producción bacteriana de celulasas para degradar material lignocelulósico*

Autor: Sharoom Colombia Hernández Salamanca, Silvia Marcela Rodríguez Cuadros**

Palabras Clave: Material lignocelulósico, celulasas, bacterias, endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa.

Descripción: La presente investigación tuvo como finalidad desarrollar una revisión sistemática de la producción bacteriana de celulasas para la degradación de material lignocelulósico, identificando los microorganismos principales involucrados en este proceso. Se llevó a cabo una revisión bibliográfica con la ayuda de editoriales como Springer, Elsevier, Taylor & Francis, lo que permitió encontrar una totalidad de 401 artículos, de los cuales finalmente se seleccionaron 67 artículos para la extracción y categorización de datos relevantes para la investigación, entre ellos: Bacterias asociadas, producción de celulasas, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, pruebas de screening, pruebas de actividad enzimática, purificación y aplicaciones de las celulasas.

Dentro de las bacterias más destacadas para la producción de celulasas se encuentran: *Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis*, *Klebsiella sp*, y *Paenibacillus polymyxa*, las cuales son capaces de producir las tres enzimas principales: Endoglucanasa, Exoglucanasa y Beta-Glucosidasa, a partir de material lignocelulósico como fuente de carbono: Bagazo de caña de azúcar, paja de arroz, paja de hierba, cascarilla de trigo, aserrín y sustratos comerciales como: Carboximetil celulasa (CMC); Avicel, y celobiosa.

El método DNS fue la técnica de medición de actividad enzimática con mayor frecuencia dentro de la investigación, se encontró que para el género *Bacillus*, los valores de endogluclanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa estuvieron cercanos a: 21,71 U/ml, 16,07 U/ml y 0,464 U/ml, respectivamente.

Las celulasas son enzimas con características especializadas en la degradación de celulosa, debido a esto, se encontraron estudios donde se investigaba su aplicación en diversos sectores de la industria (pulpa y papel, textil, alimentario, producción bioetanol, etc).

*Trabajo de Grado

**Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Viviana Sanchez Torres Ingeniera Química, Ph. D. Codirector: María Angélica Angarita Rangel, Ingeniera Química, M.Sc.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Abstract

Title: Systematic review of the literature on the bacterial production of cellulases to degrade lignocellulosic material*

Author: Sharoom Colombia Hernández Salamanca, Silvia Marcela Rodríguez Cuadros**

Keywords: Lignocellulosic material, cellulases, bacteria, endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase.

Description: The purpose of this research was to develop a systematic review of the bacterial production of cellulases for the degradation of lignocellulosic material, identifying the main microorganisms involved in this process. A bibliographic review was carried out with the help of publishers such as Springer, Elsevier, Taylor & Francis, which allowed finding a total of 401 articles, of which 67 articles were finally selected for the extraction and categorization of data relevant to the investigation. , among them: Associated bacteria, production of cellulases, carbon source, nitrogen source, screening tests, enzyme activity tests, purification and applications of cellulases.

Among the most outstanding bacteria for the production of cellulases are: *Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis*, *Klebsiella* sp, and *Paenibacillus polymyxa*, which are capable of producing the three main enzymes: Endoglucanase, Exoglucanase and Beta-Glucosidase, from material Lignocellulosic as a carbon source: Sugarcane bagasse, rice straw, grass straw, wheat husk, sawdust and commercial substrates such as: Carboxymethyl cellulase (CMC); Avicel, and cellobiosa.

The DNS method was the technique for measuring enzymatic activity with the highest frequency within the investigation, it was found that for the genus *Bacillus*, the values of endogluclanase, exoglucanase and β -glucosidase were close to: 21.71 U/ml, 16,07 U/ml and 0.464 U/ml, respectively.

Cellulases are enzymes with specialized characteristics in the degradation of cellulose, due to this, studies were found where their application was investigated in various sectors of the industry (pulp and paper, textiles, food, bioethanol production, etc.).

*Degree work

**Faculty of physicochemical engineering. Chemical engineering school. Director: Viviana Sanchez Torres Chemical engineer Ph. D. Co-director: María Angélica Angarita Rangel, Chemical engineer M.Sc.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Introducción

En el mundo, los residuos vegetales son el recurso renovable más grande que existe, se considera que más del 85% de los residuos agrícolas y un gran porcentaje de residuos agroindustriales son de este tipo (Cruz C. et al., 2011). En este sentido, se estima que anualmente se forman 200.000 millones de toneladas de material lignocelulósico residual de las cuales una fracción es utilizada para forrajes, composta y obtención de energía térmica (Vigueras, Gabriel; Figueroa Montero, Arturo; Hernández Guerrero, 2019). Sin embargo, de manera general, en la agroindustria estos residuos son considerados productos de desecho por lo que son incinerados en condiciones inadecuadas, generando un aumento en los gases de efecto invernadero, lo que contribuye al calentamiento global (Cortes Ortiz, 2014)

Esta biomasa lignocelulósica, dependiendo de su variedad, está compuesta en mayor parte por celulosa (25-55%), hemicelulosa (20-50%) y lignina (5-30%), además de una gran variedad de compuestos orgánicos (grasas, ceras, alcaloides, proteínas, fenoles simples y complejos, entre otros) y compuestos inorgánicos, como las cenizas (Maryen et al., 2018). De los principales componentes del material lignocelulósico, la celulosa un homopolímero lineal de D-glucosa unido por enlaces β -1,4-glicosídicos, es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza, ya que conforma la mayor parte de la biomasa terrestre siendo componente estructural de plantas tanto terrestres, como acuáticas y macroalgas (Vigueras, Gabriel; Figueroa Montero, Arturo; Hernandez Guerrero, 2019). La celulosa se ha convertido en un polímero de gran interés industrial debido a la diversidad de su aplicación, puede ser empleada en la producción de biocombustibles en el mercado de las biorefinerías, biopulido y bioacabados, en la industria textil y en la extracción y procesamientos de frutas o verduras, en la industria alimentaria; incluso es considerada materia

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

prima apta para la obtención de compost y para el desarrollo de otros productos químicos de valor agregado (Jayasekara & Ratnayake, 2019).

Las celulasas son enzimas que permiten degradar la celulosa en azúcares fermentables como la glucosa por medio de mecanismos de hidrólisis (Cortes Ortiz, 2014), por este motivo, representan una alternativa eficiente que trabaja bajo condiciones de operación sencillas (Vigueras, Gabriel; Figueroa Montero, Arturo; Hernández Guerrero, 2019), con el fin de disminuir costos en la obtención de biocombustibles y productos químicos de importancia comercial (Cortes Ortiz, 2014). Las celulasas pueden ser producidas por diferentes microorganismos entre los cuales se destacan los hongos y las bacterias, sin embargo, las fuentes bacterianas, en especial del género *Bacillus* han tenido gran auge debido a la alta actividad específica, la eficiencia de producción heteróloga de los sistemas bacterianos y la resistencia a ser inhibida por glucosa o celobiosa (Ovando-chacón & Waliszewski, 2005). Las comunidades bacterianas con alto potencial para degradar material celulósico son aisladas de diferentes entornos de biomasa vegetal, entre los cuales se destacan los lodos, los suelos, las aguas termales e incluso los organismos de algunos invertebrados (Martínez-Anaya et al., 2008).

El presente trabajo de grado pretende dar respuesta a la pregunta ¿Cómo se da la producción, caracterización y purificación de celulasas bacterianas capaces de degradar material lignocelulósico? Mediante una revisión sistemática de la literatura se buscó obtener información que servirá de base para futuras mediciones de la actividad enzimática de bacterias celulolíticas pertenecientes al cepario del Grupo de Investigaciones en Minerales, Biohidrometalurgia y Ambiente (GIMBA), para la línea de investigación: Remediación ambiental, tratamiento de efluentes y valorización de residuos.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Realizar una revisión sistemática de la literatura sobre la producción bacteriana de enzimas celulasas para degradar material lignocelulósico.

1.2 Objetivos específicos

- Identificar las diferentes cepas bacterianas productoras de enzimas celulasas y sus condiciones de cultivo.
- Describir las enzimas más estudiadas y su actividad enzimática.
- Conocer las técnicas de purificación y caracterización fisicoquímica de celulasas.
- Realizar una revisión de la literatura sobre las aplicaciones de celulasas en diversas industrias.

2. Marco conceptual

2.1. Material lignocelulósico

El material lignocelulósico es un tipo de biomasa vegetal que proviene principalmente de bosques, cultivos agrícolas, residuos de cosechas y otros residuos agroindustriales como residuos de la industria de la madera y residuos de la industria del papel; por este motivo es considerado como la fuente de energía, a partir de materia orgánica renovable, más abundante en nuestro planeta (Khan et al., 2022).

La biomasa lignocelulósica se encuentra conformada por componentes estructurales y componentes secundarios (Barroso Casillas, 2010). Los componentes estructurales comprenden tres polímeros diferentes: la celulosa, la hemicelulosa y la lignina; donde la proporción de estos

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

polímeros varía dependiendo de la fuente de material lignocelulósico (Rubin, 2008). Los componentes secundarios se encuentran en menor proporción, y son denominados extractos y cenizas (Barroso Casillas, 2010).

2.2. Degradación de celulosa por hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es un método que se basa en la interacción química de un grupo de enzimas como las celulasas, con el fin de romper las conexiones de la pared celular y de esta manera transformar la biomasa lignocelulósica en azúcares (Niju et al., 2019).

El proceso de hidrólisis enzimática consta de varios pasos. Inicialmente se da la transferencia de enzimas desde la fase acuosa a la superficie de la celulosa, posteriormente ocurre el proceso de adsorción de las enzimas y la formación de complejos enzima-sustrato, luego se da lugar a la hidrólisis en fase líquida de la celulosa y la transferencia de los productos de hidrólisis de la superficie de las partículas celulósicas a la fase acuosa a granel, y finalmente ocurre la hidrólisis de celodextrinas y celobiosa a glucosa en la fase acuosa y la desorción de la celulasa (Fan, 2014). Este método se realiza a condiciones bajas de temperatura, en un rango de 40 °C a 50 °C, con el objetivo de evitar la corrosión y obtener rendimientos de hidrólisis superiores a los obtenidos mediante la hidrólisis química (García Martín et al., 2010).

2.3. Celulasas

Las celulasas son un complejo enzimático producido por hongos y bacterias, las cuales son las responsables de la degradación de celulosa. Este grupo de enzimas pertenece a la superfamilia de las glicosil hidrolasas, especializadas en el rompimiento y descomposición del enlace glucosídico β -1,4 de la celulosa transformándola en glucosa con el propósito de metabolizarla y degradar en azúcares fermentables (X. Zhang & Zhang, 2013).

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

La complejidad estructural de la celulosa ha limitado el aprovechamiento de este material, por lo que para su hidrólisis se requiere de la unión de tres tipos de enzimas: endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas (Gutiérrez-Rojas et al., 2015).

2.3.1. Endoglucanasa

Este tipo de enzimas son producidas por arqueas, bacterias, hongos y algunas plantas, son las encargadas de la hidrólisis de los enlaces 1,4- β -glucosídicos, liberando una molécula de celobiosa. Cortan al azar en el interior de la celulosa amorfa, generando oligosacáridos de varias longitudes de cadena y, en consecuencia, nuevos extremos de cadena. En la mayoría de los casos, las endoglucanasas fúngicas poseen un módulo catalítico con o sin un CBM (Carbohydrate Binding Module), mientras que la endoglucanasa bacteriana puede poseer múltiples módulos catalíticos, CBM y otros módulos con función desconocida (Ge X, 2018).

2.3.2. Exoglucanasa

Las enzimas exoglucanasas actúan de una manera progresiva en los extremos reductores y no reductores de las cadenas del polisacárido, es decir en regiones de baja cristalinidad, descomponiendo los enlaces 1,4 β -D-glucano, liberando glucosa o celobiosa como producto principal (Ge X, 2018).

2.3.3. β -glucosidasa

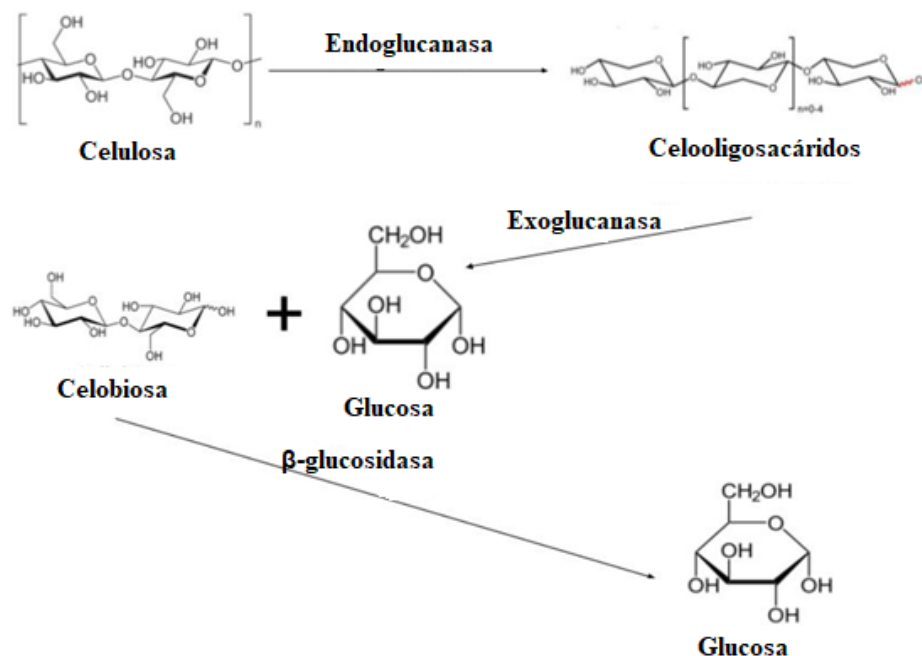
Hidrolizan los enlaces β -D-glucosídicos de la celobiosa para producir glucosa, de manera que se evita el efecto inhibitor en las enzimas endoglucanasas y exoglucanasas por acumulación de celobiosa (Ge X, 2018).

La figura 1 nos muestra la conversión de celulosa a monómeros de glucosa mediante la acción de las celulasas.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Figura 1.

Degradación de celulosa por endoglucanasas, exoglucanasas y β - glucosidasas.



Nota. Adaptado de Nitya Aryasomayajula et al, 2019.

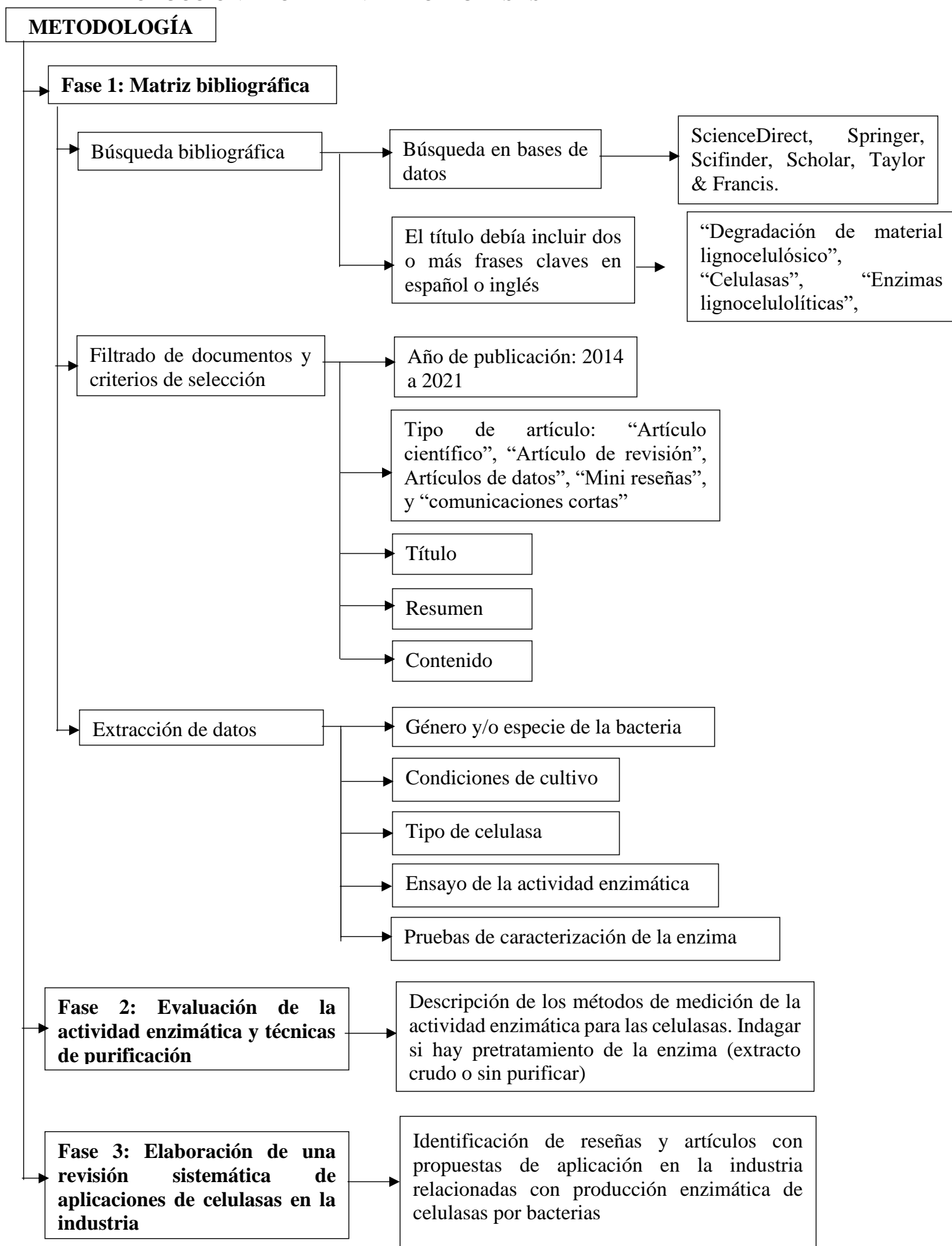
3. Metodología

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se llevó a cabo una revisión sistemática de la literatura acerca de la producción bacteriana de enzimas para degradar material lignocelulósico; lo anterior, con el fin de evaluar, sintetizar e identificar artículos relevantes relacionados con el tema de estudio y comparar la información que estos proveen con la de otras observaciones similares, a modo de brindar un punto de partida para el desarrollo de nuevas investigaciones. En la figura 2 se resumen las etapas desarrolladas a lo largo de la metodología:

Figura 2.

Etapas desarrolladas a lo largo de la metodología

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS



PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

3.1. Búsqueda bibliográfica

La búsqueda de documentos se realizó mediante las bases de datos: ScienceDirect, Springer, Scifinder Scholar y Taylor & Francis, así como otras fuentes de información adicionales como: Google Scholar.

La revisión se delimitó en el rango de 2014 a 2021 y se centró en estudios que incluyeran dentro del título y/o resumen palabras clave (en español e inglés) como: “Degradación de material lignocelulósico”, “Celulasas”, “Enzimas lignocelulolíticas”, “Celulasa bacteriana”; de igual manera, con el fin de facilitar el proceso investigativo y definir el objeto de estudio, se establecieron ecuaciones de búsqueda empleando términos como “AND” y “OR” así como el uso de distintas combinaciones de palabras claves en las bases de datos ya mencionadas.

3.1.1. Filtrado de documentos y criterios de selección

Una vez finalizada la búsqueda, los artículos encontrados fueron compilados dentro de una matriz de Excel para así, ser posteriormente sometidos a un proceso de filtrado, selección y descarte con el fin de identificar los documentos que aportaran información de valor a los objetivos de la revisión.

En este sentido, se establecieron cinco parámetros de selección para el filtrado de artículos, los cuales se mencionan continuación:

Año: Uso de artículos con un año de publicación entre 2014 y 2021.

Tipo de artículo: Se seleccionaron documentos únicamente de tipo “Artículo científico”, “Artículo de revisión”, “Artículos de datos”, “Mini reseñas” y “comunicaciones cortas”.

Título: El título debía incluir la combinación de uno o más de los términos claves establecidos dentro de la metodología de investigación: “Degradación de material

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

lignocelulósico”, “Celulasas”, “Enzimas lignocelulolíticas”, “Celulasa bacteriana”; y a su vez, debía expresar relación con el objeto de estudio: Producción/purificación/caracterización de enzimas bacterianas para la degradación de material celulósico.

Resumen: Se seleccionaron los que presentaban de manera clara los objetivos, metodología y resultados de la investigación relacionados con la degradación de material celulósico por medio de enzimas bacterianas.

Contenido: Tras tener en cuenta los criterios propuestos anteriormente, se comprobó si los artículos de investigación seleccionados tenían relación con el objeto de estudio y si respondían a los objetivos de la revisión.

Finalmente, se seleccionaron todos aquellos estudios que abarcaran el tema de la degradación de material celulósico mediante enzimas bacterianas y que reportaran datos, cifras u información relevante a cerca de los siguientes factores:

- Material lignocelulósico: Composición física y química del sustrato de trabajo (Carbono, Nitrógeno, %Humedad, pH)
- Aislamiento, condiciones de cultivo y producción de microorganismos bacterianos. (Temperatura, presión, pH óptimos)
- Identificación, métodos caracterización y purificación de enzimas bacterianas celulolíticas.
- Métodos y medición de la actividad enzimática.

3.1.2. Extracción de datos

En esta etapa se realizó la extracción de datos de interés de cada uno de los artículos que fueron seleccionados anteriormente. Se sintetizó la información en una matriz bibliográfica

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

realizada en Excel, en la cual se incorporaron por medio de columnas los siguientes criterios de clasificación: Género y/o especie de la bacteria, condiciones de cultivo de la bacteria, tipo de celulasa producida por la bacteria, ensayo de la actividad enzimática y pruebas de screening de la enzima, DOI y referencias del documento. Las referencias se organizaron empleando el gestor bibliográfico Mendeley. Asimismo, se realizó una clasificación de los artículos seleccionados por año de publicación, para posteriormente efectuar un análisis acerca de la tendencia en investigaciones atinentes a la producción de celulasa bacteriana. Los datos obtenidos en esta clasificación fueron representados por medio de diagramas de barras, usando Microsoft Excel.

3.2.FASE 2: Evaluación de actividad enzimática y técnicas de purificación

A partir de los artículos seleccionados en la fase anterior, se tuvieron en cuenta aquellos en los que se detallaran los métodos de medición de la actividad enzimática para las celulasas; asimismo, se evaluó si en estas investigaciones se hacía un procesamiento de la enzima, dado que se puede emplear el extracto crudo, es decir, la enzima sin purificar o la enzima previamente purificada. Las técnicas fueron clasificadas según el tipo de método usado: técnicas de medición enzimáticas cualitativas y técnicas de medición enzimática cuantitativas.

3.3.FASE 3: Elaboración de una revisión sistemática de aplicaciones de celulasas en la industria

Durante la última fase del trabajo de investigación se desarrolló una investigación con énfasis en las aplicaciones de enzimas celulasas bacterianas.

En primera medida, se identificaron reseñas y artículos con propuestas de aplicación en la industria relacionadas con producción enzimática de celulasas por bacterias, posteriormente se extrajeron datos relacionados con el campo de aplicación, la aplicación directa y una descripción acerca de la misma.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

La información obtenida en el proceso anterior fue recopilada y comparada en una matriz de Excel con el fin de evaluar la importancia de las celulasas en la industria.

4. Resultados

4.1. Búsqueda bibliográfica

Se emplearon las ecuaciones de búsquedas presentadas en la tabla 1, con las que se obtuvieron un total de 5002 resultados.

Tabla 1.

Búsqueda inicial

BÚSQUEDA INICIAL			
n	Fuente	Ecuación de búsqueda	Resultados
1	Science Direct		2790
2	Springer	Degradation AND lignocellulosic material AND bacterial cellulase	1824
3	Taylor & Francis	AND enzyme AND enzyme	371
4	Scifinder		17
TOTAL			5002

4.2. Proceso de filtrado y selección de documentos

Los documentos obtenidos en la búsqueda inicial fueron sometidos a cinco filtros. El primer parámetro que se tuvo en cuenta fue el de: tipo de artículo, cuyos resultados indican que la mayor cantidad de documentos extraídos de las bases de datos fueron del tipo: artículo de investigación. Asimismo, se depuraron 1494 documentos para un total de 3508 artículos con los cuales se continuó al segundo filtro: año de publicación.

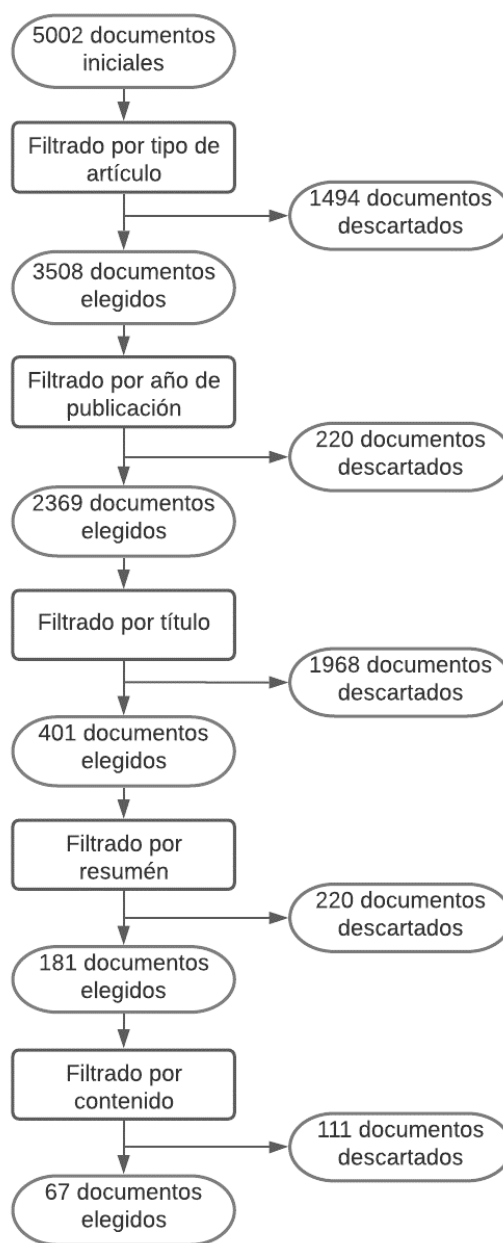
Por otra parte, teniendo en cuenta los datos obtenidos en el segundo filtro: año de publicación, fue posible observar que los documentos científicos atinentes a la degradación de

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

celulosa por celulasas bacterianas se encontraban en aumento. Considerando que la búsqueda de artículos se realizó hasta el mes de octubre del año 2021, no se puede determinar con precisión la tendencia en la cantidad de artículos publicados en comparación con los años anteriores; sin embargo, podemos mencionar que hasta la fecha de búsqueda se hallaron 350 artículos para el año 2021.

Considerando los parámetros mencionados en la sección 3.1.2, se continuó con el proceso de filtrado por título, resumen y contenido. Los resultados de la depuración se muestran en la figura 3.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

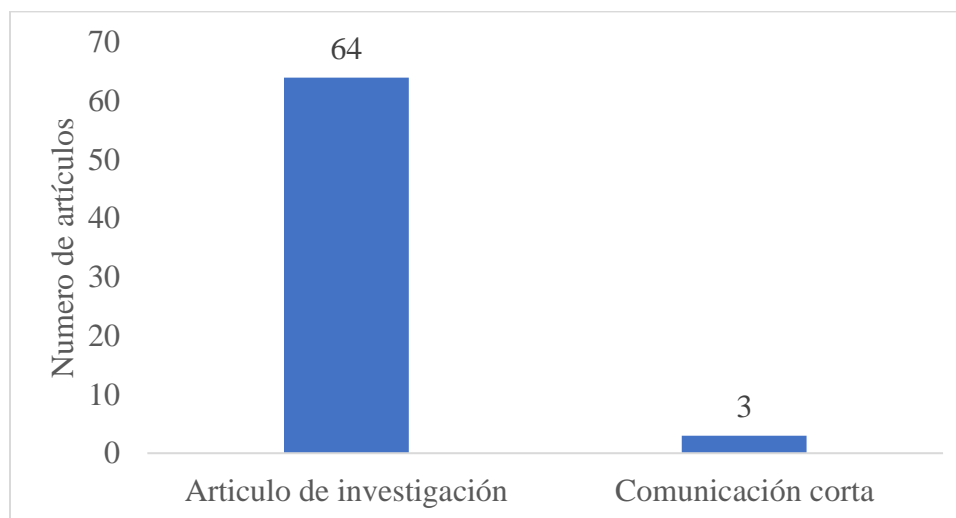
Figura 3.*Esquema global de la filtración y selección de documentos*

Al final del proceso de filtrado y selección de documentos, se encontraron 67 artículos útiles a la investigación, los cuales pertenecían en su mayoría a artículos del tipo investigación (64), mientras una pequeña porción era del tipo comunicación corta (3); la información mencionada se presenta en la figura 4.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Figura 4.

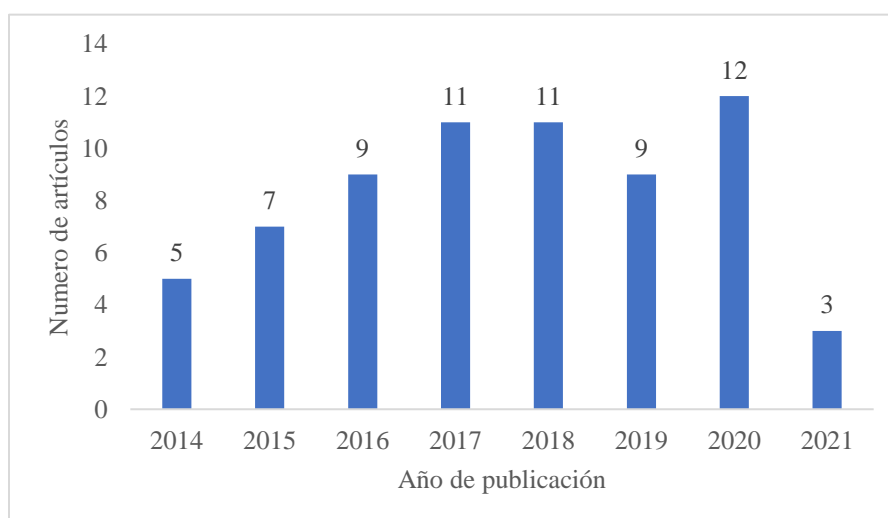
Tipo de artículos encontrados en la investigación



Igualmente, se encontró que durante los años (2017-2020) hubo una mayor publicación de artículos ajustados a los objetivos de la investigación, siendo el año 2020 el más representativo con 12 estudios al respecto. Lo anterior se muestra en la figura 5.

Figura 5.

Artículos por año de publicación



PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

En la actualidad, países como: India, China, Tailandia e Irán son los que presentan mayor interés en el uso de bacterias celulolíticas para degradar material lignocelulósico, concentrando el mayor número de investigaciones publicadas en este tema: India 31,34% (21 de 67 artículos), China 13,43% (9 de 67 artículos), Tailandia 7,46% (5 de 67 artículos) e Irán 7,46% (5 de 67 artículos); esto ocurre, debido que a nivel mundial, el continente asiático ha mostrado el mayor nivel de preocupación sobre el establecimiento de sistemas biosostenibles, con la implementación de nuevas plantas y la modernización de antiguas mediante el uso de tecnologías de biorremediación (Barrera & Zafra, 2018).

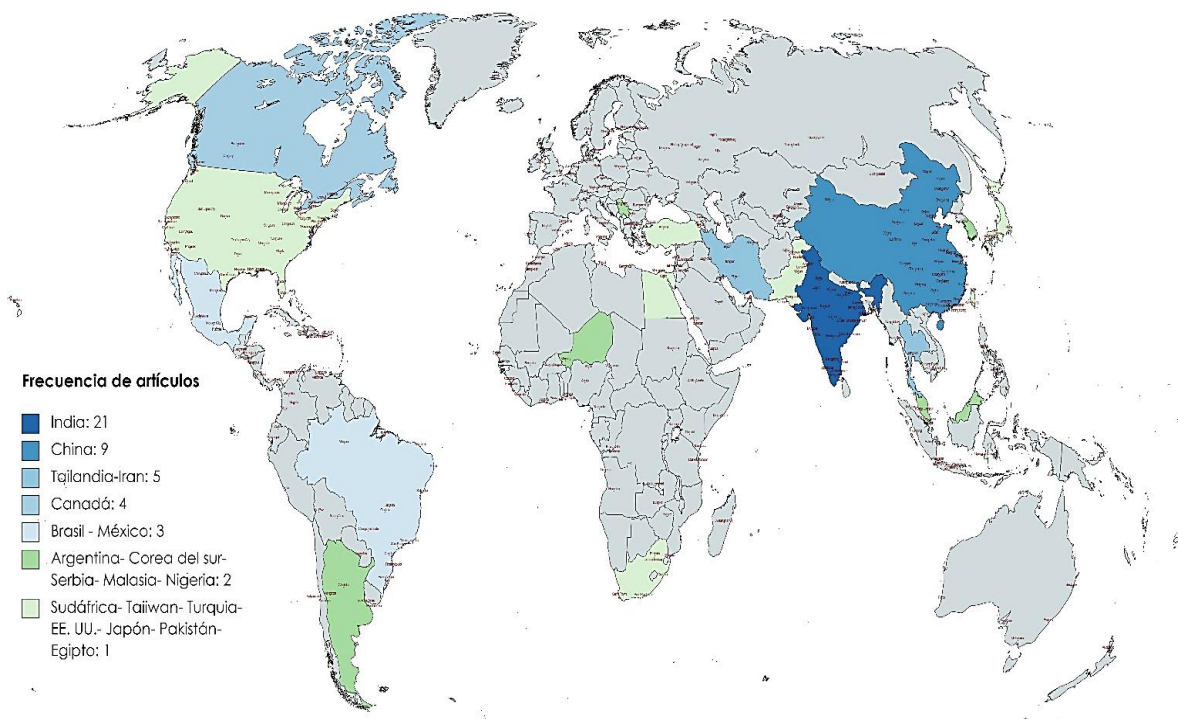
Por otra parte, Latinoamérica aparece como una de las zonas menos representativas en la aplicación de este tipo de tecnologías, siendo Brasil y México los que presentan el mayor número de investigaciones en el sector.

El número de artículos publicados por países y su frecuencia se presenta en la Figura 6.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Figura 6.

Artículos publicados por países



4.3. Bacterias productoras de celulasas

Se identificaron 27 géneros de bacterias celulolíticas, entre las cuales se destacan las del género *Bacillus*, debido a su capacidad para excretar grandes cantidades de enzimas en el medio de cultivo, así como a sus rápidas tasas de crecimiento en comparación a otras especies bacterianas (Lee et al., 2016). Éste género bacteriano permite la degradación de material celulósico como: residuos sólidos (granos de destilería china (Yang et al., 2021), paja de pasto (Dar, Pawar, Chintalchere, et al., 2019), paja de arroz (Shajahan et al., 2017), mazorca de maíz (Oni et al., 2020) entre otros).

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

De igual manera, géneros como *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Clostridium* y *Enterobacter* exhiben capacidades celulolíticas en residuos de bagazo de caña, rastrojo de maíz (S. Zhang et al., 2019), pasto en polvo, cascarilla de sorgo y paja de trigo.

4.3.1. Crecimiento bacteriano

Para que el crecimiento bacteriano tenga lugar, es necesario un aporte adecuado de nutrientes. Toda bacteria celulolítica requiere una fuente de carbono, nitrógeno, hidrógeno, oxígeno y demás minerales aptos para su desarrollo (Barrero Laura, 2016).

4.3.1.1. Medio de cultivo

De los principales factores que permiten el crecimiento microbiano de bacterias celulolíticas se encuentra el medio de cultivo. Para la producción de bacterias celulolíticas se emplean en su mayoría medios minerales o definidos tales como: Medio Mineral (Siu-Rodas et al., 2018), Medio Luria-Bertani (LB) (Almuharef et al., 2020), Medio Bushnell Hass (BHM) (Saffari et al., 2017), Medio Sal Mínima de Berg (BMS) (Dar et al., 2018). La tabla 2 describe las bacterias celulolíticas encontradas en la investigación junto con el medio de cultivo empleado para su crecimiento.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Tabla 2.*Medios de cultivo para el crecimiento de bacterias celulolíticas*

Bacteria	Medios de cultivo	Frecuencia
<i>Paenibacillus sp.</i>	Agar Luria-Bertani (LB)	1
	Medio Berg Minimal Salt (BMS)	2
<i>Bacillus sp.</i>	Agar Luria-Bertani (LB)	2
	Medio Bushnell Hass (BHM)	5
	Medio mineral	2
	Medio Berg Minimal Salt (BMS)	2
<i>Acinetobacter sp.</i>	Medio mineral	1
<i>Enterobacter sp.</i>	Medio Bushnell Hass (BHM)	1
<i>Xanthomonas sp.</i>	Agar Luria-Bertani (LB)	1
<i>Fictibacillus sp.</i>	Luria-Bertani (LB)	1
<i>Klebsiella sp.</i>	Medio Berg Minimal Salt (BMS)	2
	Medio Bushnell Hass (BHM)	1

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Bacteria	Medios de cultivo	Frecuencia
<i>Escherichia sp.</i>	Agar Luria-Bertani (LB)	2
<i>Pseudomonas sp.</i>	Medio Bushnell Hass (BHM)	2
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	Medio Berg Minimal Salt (BMS)	1

4.3.1.2.Fuente de carbono

Todo microorganismo vivo requiere de una fuente de carbono para que su sistema pueda funcionar, normalmente esta fuente de energía proviene de azúcares sencillos como la glucosa, lactosa, sacarosa, celobiosa, celulosa (Barrero Laura, 2016) y algunos derivados como la carboximetilcelulosa (CMC) (Gastelum-Arellanez et al., 2014) ; sin embargo, también existen algunos organismos celulolíticos que pueden emplear distintos compuestos orgánicos complejos para su desarrollo, como lo son la paja de arroz (Tantayotai et al., 2017) pasto seco (Ahmed et al., 2018), aserrín (Kamsani et al., 2016), bagazo de caña de azúcar (Dantur et al., 2015), polvo de ramio (Chen et al., 2020) entre otros.

4.3.1.3.Fuente de nitrógeno

En diversos artículos se ha investigado la influencia de la fuente de nitrógeno sobre la producción de bacterias celulolíticas. En general, existen dos tipos de fuentes de nitrógeno, fuentes orgánicas e inorgánicas; la primera, asociada a moléculas orgánicas como las proteínas, los ácidos nucleicos o metabolitos finales como la urea y la segunda, asociada a sales de amonio (acetato de

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

amonio, nitrato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, entre otras), (Serpa Ibáñez & Calderón Rodríguez, 2006).

El apéndice A resume las bacterias celulolíticas más frecuentes encontradas a lo largo de la investigación, así como el medio de cultivo, fuente de carbono y fuente de nitrógeno empleados para su crecimiento junto con el rango de valores asociado a cada característica.

4.4. Tipos de celulasa

La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinérgica de un grupo de celulasas (Ovando-chacón & Waliszewski, 2005), enzimas pertenecientes al grupo de las glicosil hidrolasas conformadas según su actividad por: endo- β -1,4-glucanasas, exo- β -1,4-glucanasa, β -1,4-glucosidasa (celobiasa) (Marín Alavarado, 2007), que degradan la celulosa a oligosacáridos, hasta llegar al monosacárido que compone la celulosa: la glucosa (Herrera, 2015).

En la presente investigación se identificaron las cepas bacterianas más representativas en la producción de celulasas; Oke et al., 2017 investigó la capacidad de degradación de residuos de arroz a partir de bacterias celulolíticas, donde *Cellvibrio japonicus*, bacteria Gram-negativa, tuvo la mayor producción de celulasa total (0,041 U/ml) y endoglucanasa (0,141 U/ml), mientras *Bacillus aerius*, bacteria Gram-positiva produjo la mayor cantidad de exoglucanasa (0,141 U/ml) y B- glucosidasa (0,029 U/ml). Las dos cepas fueron capaces de producir las tres enzimas celulolíticas principales (endoglucanasa, exoglucanasa, B-glucosidasa).

Dar et al., 2018 aisló e identificó bacterias degradadoras de celulosa a partir del intestino del gusano de algodón, obteniendo un aislado de *Klebsiella sp*, a la cual se le probó su capacidad celulolítica por medio de diversos sustratos agrícolas como la paja de hierba, cáscara de trigo,

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

bagazo de caña de azúcar, aserrín, rastrojo de maíz y fuentes disponibles comercialmente como CMC, avicel, papel de filtro, obteniendo actividades altas de endoglucanasa, exoglucanasa y B-glucosidasa empleando aserrín como fuente de carbono.

4.4.1. Pruebas de caracterización enzimática de celulasas

Para la caracterización de enzimas celulolíticas se llevan a cabo técnicas moleculares que permiten identificar el tipo de enzima y su masa molecular; una de las técnicas más representativas en este campo es la electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) la cual permite la separación y purificación de proteínas cargadas por migración en función de la masa molecular siendo considerada una técnica sencilla, rápida y altamente reproducible (Pérez Chabela et al., 2015). Para el desarrollo del método, al aplicarse la muestra al gel de poliacrilamida suele añadirse un agente que haga la muestra más densa como glicerina o sacarosa. Igualmente, para seguir el avance de la separación, se añade un colorante como azul de bromofenol, que sirve como referencia (Alcalá, 2013).

Mihajlovski et al., 2015 detectó la actividad de la enzima avicelasa (exoglucanasa) en la bacteria *Paenibacillus chitinolyticus*, utilizando diferentes fuentes de carbono para su crecimiento. El análisis de zimograma mostró la producción de la enzima mientras crecía en residuos de Avicel, celobiosa y desechos de hierbas medicinales. Al emplearse un sustrato de crecimiento como celobiosa y desechos de hierbas medicinales, se produjeron dos bandas de proteína de la misma intensidad de 70 a 45 kDa, mientras que en Avicel y CMC, se produjo una banda a 45 kDa. La enzima purificada mostró entonces, la presencia de dos celulasas avicelasas a 70 y 45 kDa

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

4.4.2. Pruebas de screening

Este tipo de ensayos permiten analizar visualmente la actividad enzimática, para facilitar el aislamiento de bacterias potencialmente productoras de enzimas. Se identificaron dos tipos de pruebas cualitativas para la identificación de actividad enzimática celulasa, entre las cuales la más destacada fue la técnica con Rojo Congo. En el apéndice B se describen brevemente la metodología de las pruebas encontradas.

4.4.3. Ensayo de actividad enzimática

Los ensayos de actividad enzimática son métodos que permiten medir las cantidades de enzimas específicas en una muestra (Scopes, 2002). Para esto, se debe hacer crecer el cultivo bacteriano bajo las condiciones óptimas de producción enzimática (medio, pH y temperatura) teniendo en cuenta los datos brindados por la literatura (S. Singh et al., 2014).

4.4.3.1. Ensayo cuantitativo de actividad enzimática celulasa

Este tipo de pruebas utilizadas para cuantificar productos enzimáticos suelen basarse en la medición de los azúcares reductores liberados (Moreno & Vélez, 2011). Luego de la incubación de la enzima, es necesario realizar una centrifugación previa a una temperatura de 4 °C, durante un estimado de 10-30 minutos (Chantarasiri, 2015; Kamsani et al., 2016; Moreau et al., 2015), de donde se obtiene el sobrenadante libre de células empleado para evaluar la actividad enzimática (Yu & Li, 2015). En la presente revisión bibliográfica se encontraron diferentes métodos usados para la cuantificación de azúcares reductores (Apéndice C), sin embargo, el método más frecuente fue el Reactivo DNS y su metodología para cada celulasa se encuentra en la Figura 7.

En el apéndice E se encuentran las tablas de frecuencia para ensayos de actividad enzimática cualitativa y cuantitativa.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

La endoglucanasa fue la enzima con mayor cantidad de estudios de actividad enzimática, esto debido a su diversidad en usos industriales. En la tabla 3, se pueden observar los porcentajes de estudios que ensayaron actividad enzimática para cada celulasa.

Tabla 3.

Porcentaje de artículos que realizaron ensayos de actividad enzimática

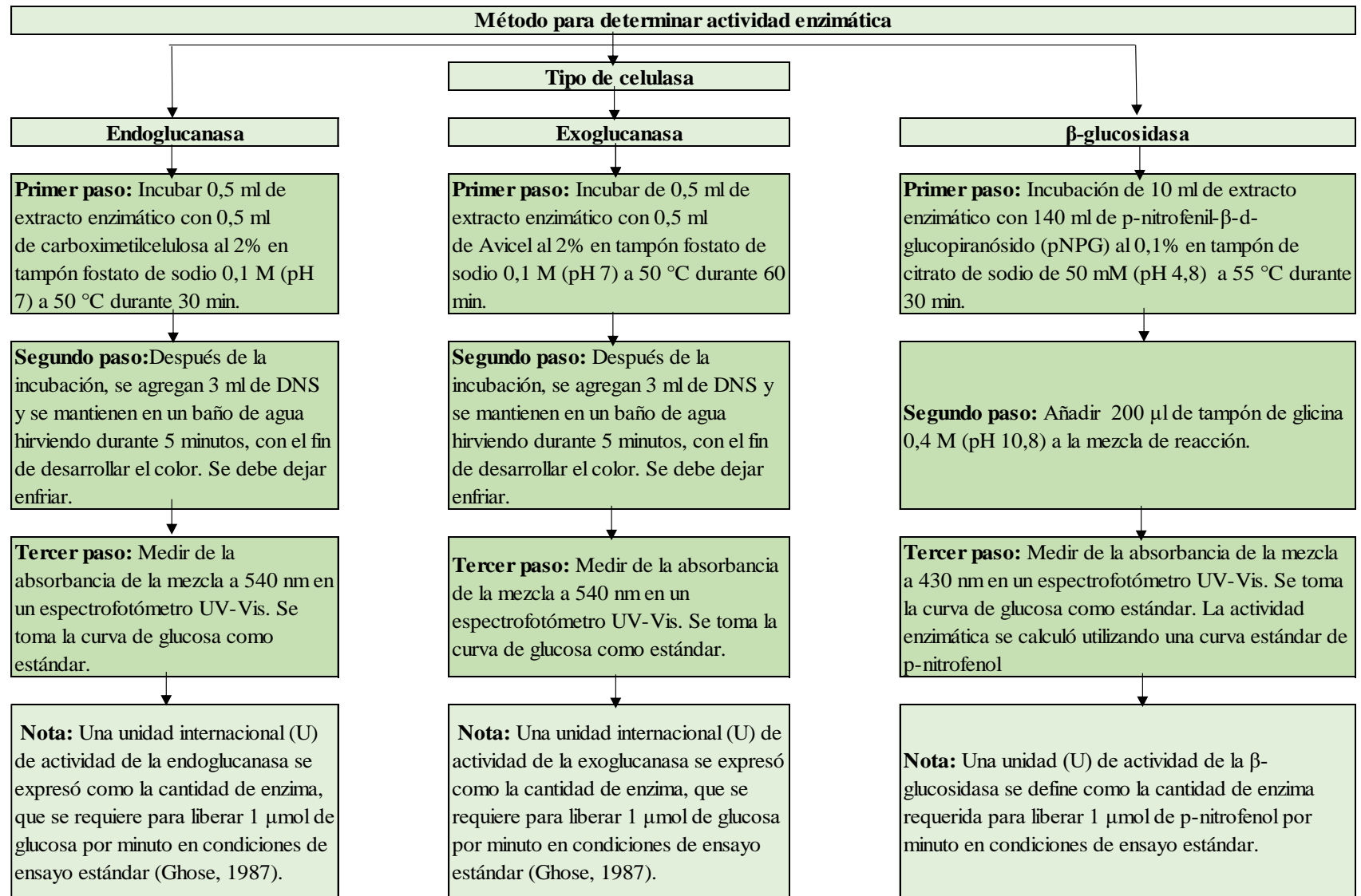
Celulasa	Porcentaje de artículos
Endoglucanasa	64%
Exoglucanasa	18%
β-glucosidasa	18%

En el Apéndice F, se detallan las condiciones de pH y temperatura a las cuales se realizaron los ensayos de actividad enzimática para las diferentes cepas bacterianas y celulasas. Adicional a esto, se encuentran los valores de actividad enzimática para cada estudio.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Figura 7.

Metodología para la cuantificación de actividad enzimática de celulasas.



PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

4.4.3.2. Condiciones óptimas para la actividad enzimática de las celulasas

Se encontraron datos en la literatura acerca de la influencia en la actividad enzimática de algunos factores como sustrato, temperatura, pH, salinidad, presencia de disolventes orgánicos y iones metálicos. Scopes, 2002, menciona la importancia de conocer los rangos y/o puntos óptimos para que la producción de celulasas y su actividad enzimática sea máxima.

4.4.3.2.1. Sustrato

Con el fin de optimizar la producción de endoglucanasa se realizaron ensayos de actividad enzimática variando el sustrato. Shajahan et al., 2017, evaluó cinco fuentes de carbono para determinar la mejor opción en producción de celulasa por *Bacillus Lichenformis*. En este estudio, se emplearon fuentes de carbono como bagazo pretratado, mazorca de maíz, paja de arroz, papel de filtro y CMC al 0,5% (p/v), se utilizaron por separado en los medios para mejorar el crecimiento de bacterias y la producción de celulasa. En la tabla 4, se observan los resultados de actividad celulasa para *Bacillus Lichenformis* empleando los distintos sustratos mencionados.

Tabla 4.

Efecto del sustrato en la producción de celulasas para Bacillus Lichenformis

Fuente de carbono	Actividad celulasa (U/ml)
Bagazo	13,97+0,52
Mazorca de maíz	11,64+0,9
Paja de arroz	7,3+0,67
Papel de filtro	8,26+0,2
CMC	14,27+0,35

Nota. Adaptado de Shajahan et al., 2017

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

De la tabla 4 se concluye que el sustrato que mostró mayor actividad endoglucanasa fue CMC, seguido del bagazo y la mazorca de maíz. Los resultados determinados por Shajan et al., 2017 son coherentes con resultados obtenidos por da Silva et al., 2021, López-Domínguez et al., 2019 y Yu & Li, 2015 para endoglucanasas producidas por bacterias diferentes a *Bacillus*.

4.4.3.2.2. Fuente de nitrógeno

Kumar et al., 2019 estudió el efecto de la fuente de nitrógeno orgánico sobre la expresión endoglucanasa en una cepa de *Escherichia coli*. Los resultados mostraron un aumento del 66% en la producción de endoglucanasas al utilizar extracto de levadura como fuente de nitrógeno. El aumento en la producción enzimática se atribuye a los aminoácidos y vitaminas proporcionados por estos nutrientes, lo cual puede hacer que disminuya la carga celular para la expresión endoglucanasa.

Otros autores como Azadian et al., 2017, estudiaron el efecto de fuentes orgánicas e inorgánicas de nitrógeno para la producción de endoglucanasa de *Bacillus sonorensis*, encontrando que el sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ era la fuente adecuada para la producción de esta enzima, al igual que para *B. subtilis*. Otro informe sugirió que, el cloruro de amonio, NH_4Cl inorgánico indujo la producción de celulasa en *Bacillus* sp. (Sadhu et al., 2013).

Shajan et al., 2017, realizó el ensayo de actividad enzimática para una cepa de *Bacillus Licheniformis* variando la fuente de nitrógeno para observar el impacto que esta tenía sobre la producción endoglucanasa, al igual que otros investigadores (Adıgüzel & Tunçer, 2017, Ahmad et al., 2020, Kumar et al., 2019). Shajan et al., 2017, afirma que el uso de extracto de levadura potencializa la producción de celulasas. En la tabla 5, se muestran los resultados obtenidos en esta investigación.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Tabla 5.*Efecto de la fuente de nitrógeno en la actividad enzimática celulasa*

Fuente de nitrógeno	Actividad celulasa (U/ml)
Extracto de levadura	12,59+0,23
Peptona	12,09+0,16
Extracto de harina de soya	12,37+0,38
Triptona	11,48+0,46
Urea	11,86+0,69

Nota. Adaptado de Shajahan et al., 2017

4.4.3.2.3. Temperatura

Uno de los factores fundamentales a estudiar es la temperatura, dado que además de afectar la actividad enzimática, una temperatura muy alta puede generar desnaturalización de la enzima y por ende, una reducción en la formación de producto (Scopes, 2002). Da Silva et al., 2021, informa que las bacterias del género *Bacillus* producen celulasas en un rango de temperatura, que varía de 30 a 60 °C. Scopes, recomienda establecer un rango de estabilidad térmica enzimática. Yang et al., 2021, evaluó el efecto de la temperatura sobre la actividad celulasa para la bacteria *Bacillus licheniformis* incubando la mezcla de reacción enzimática a diferentes temperaturas (30-95 °C), comprobó que la temperatura de reacción óptima para la producción de endoglucanasa fue 50 °C, mientras que para exoglucanasa y β -glucosidasa fue 60 °C.

Shajan et al., 2017, observó una temperatura óptima de 42 °C para la producción de celulasas. Su estudio se basó en tomar de la literatura las temperaturas recomendadas por

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

diferentes autores y a partir de ahí realizar el ensayo enzimático variando solo la temperatura. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6.

Efectos de la temperatura en la actividad enzimática celulasa

Temperatura (°C)	Actividad celulasa (U/ml)
32	11,69+0,16
37	12,24+0,03
42	13,8+0,14
47	10,39+0,09

Nota. Adaptado de Shajahan et al., 2017

En general, los estudios de *Bacillus* reportaron una temperatura óptima para la producción de celulasas menor a 70 °C, lo cual indica su potencial en usos de degradación de celulosa a altas temperaturas.

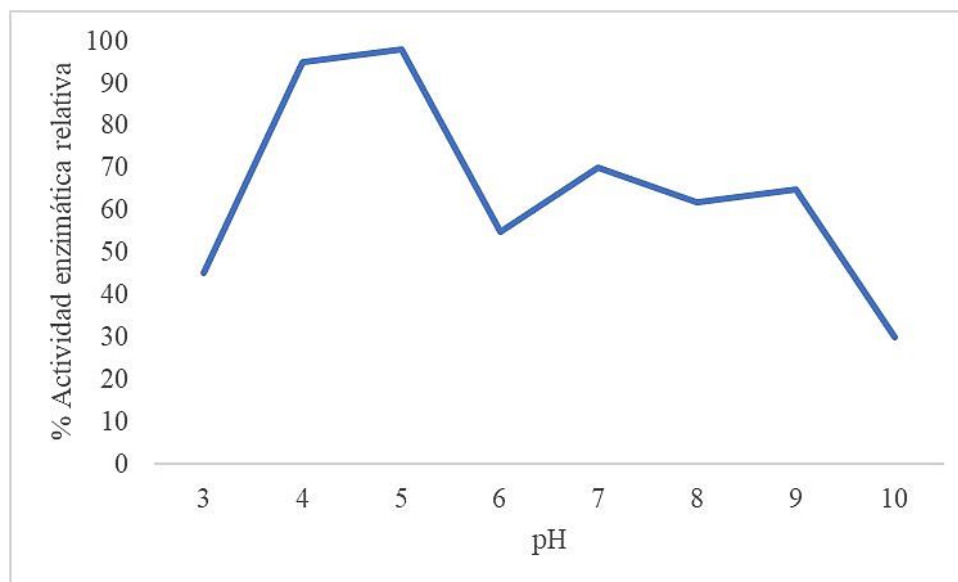
4.4.3.2.4. pH

Las enzimas son activas en ciertos rangos de pH determinados (Scopes, 2002). Para determinar el pH óptimo para la actividad enzimática, algunos autores como Dar et al., 2019, realizaron el ensayo enzimático incubando el sustrato en tampones con diferente pH. En la figura 8 se observan los resultados de este estudio y el efecto del pH en la actividad enzimática para *Bacillus Tequilensis*. El pH óptimo para la actividad celulasa hallado por Dar et al., 2019 fue de 5.0.

Figura 8.

Efecto del pH sobre la actividad endoglucanasa.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS



Nota. Adaptado de Dar et al., 2019

Shajan et al., 2017, evaluó la actividad enzimática variando el pH en un rango de 4,5 a 9,5. Observó que la actividad enzimática se redujo a pHs de 4,5 y de 9,5, mientras que para un pH de 6,5 logró el mayor resultado de actividad enzimática. La tabla 7 muestra los resultados de actividad enzimática celulasa para diferentes pHs.

Tabla 7.

Efectos del pH sobre la actividad enzimática celulasa.

pH	Actividad celulasa (U/ml)
4,5	9,23+0,23
5,5	12,87+0,29
6,5	13,62+0,68
7,5	12,33+0,38
8,5	11,17+0,47

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

9,5	8,62±0,26
-----	-----------

Nota. Adaptado de Shajahan et al., 2017

Mihajlovski et al., 2015, examinó el efecto del pH en la actividad exoglucanasa en *Paenibacillus Chitinolyticus*, para lo cual realizó réplicas variando el pH del medio de cultivo en un rango de 3 a 11. El valor de pH que mayor actividad exoglucanasa detectó fue de 4,8.

4.4.3.2.5. Salinidad

Varios autores realizaron estudios para analizar los efectos que tenía la adición de NaCl y su concentración en la actividad enzimática de las celulasas. La tabla 8 muestra las concentraciones en las que se obtuvo el mayor valor de actividad enzimática para diferentes bacterias. Yu & Li, 2015, observó una influencia positiva en la producción de celulasas por *Gracilibacillus* al añadir NaCl al medio de cultivo. Para este fin, realizó un estudio suplementando el medio de cultivo con diferentes sales, a diferentes concentraciones.

Tabla 8.

Efectos de la salinidad en la actividad enzimática celulasa

Sal	Crecimiento	Actividad enzimática (U/ml)
Ninguno	–	0
NaCl		
5%	+	15,3 ± 0,3
10%	+	107,8 ± 2,4
15%	+	59,2 ± 1,6

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Sal	Crecimiento	Actividad enzimática (U/ml)
20%	+	12,4 ± 0,4
KCl		
5%	+	6,3 ± 0,1
10%	+	79,0 ± 1,2
15%	+	30,1 ± 1,2
20%	+	10,1 ± 0,2
Na₂SO₄		
5%	+	4,4 ± 0,1
10%	+	57,5 ± 0,9
15%	+	21,1 ± 0,8
20%	-	0
NaNO₃		
(5%–20%)	+	-
Citrato de sodio		
5%	+	6,3 ± 0,2
10%	+	12,1 ± 0,3
15%	+	5,1 ± 0,3
20%	-	0

La tabla 8 muestra que el máximo valor de actividad enzimática para *Gracibacillus* se dio al añadir NaCl al 10% en el medio de cultivo.

4.4.3.2.6. Presencia de compuestos orgánicos

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Según Mahanta & Venkatesh, 1998, las enzimas tolerantes a disolventes orgánicos suelen utilizarse para aplicaciones como biorremediación de marismas saladas contaminadas con carbohidratos y aguas residuales industriales contaminadas con disolventes orgánicos.

Yu & Li, 2015 estudiaron la estabilidad de una celulasa de *Gracilibacillus sp.* en disolventes orgánicos, así como efecto de varios aditivos sobre la actividad enzimática, encontrando que el n-hexano mejoraba la actividad enzimática hasta el 117,1% mientras que se observaba una desactivación significativa en presencia de disolventes orgánicos como metanol y etanol; siendo una celulasa afín a disolventes orgánicos no polares pero inestable en disolventes polares, lo cual podría deberse a que los residuos del solvente no polar proporcionan una interfaz, lo que mantiene a la enzima en una conformación abierta y, por lo tanto, aumenta la actividad enzimática.

De igual manera, Azadian et al., 2017 investigó el efecto disolventes orgánicos sobre la actividad y la estabilidad de la CMCasa de una cepa de *Bacillus sonorensis*, donde su actividad enzimática se mejoró en presencia de algunos solventes orgánicos como metanol (166%), cloroformo (152%), éter dietílico (113%), pero disminuyó en presencia de isopropanol (73%) y dimetilformamida proponiendo las perspectivas de la celulasa para varias aplicaciones industriales.

4.4.3.2.7. Presencia de iones metálicos

Se encontraron iones metálicos cuya presencia aumenta la capacidad catalítica de las enzimas debido al mantenimiento de la arquitectura enzimática (Kumar et al., 2019). Según estudios realizados por Niu et al., 2016, la presencia de iones Mg^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} a 1,0 mM mejoró fuertemente la actividad enzimática de una cepa de *Bacillus* a 196,6%, 172,5% y 150,7%, respectivamente. Por su parte, Liu et al., 2018, observó los efectos de diferentes iones metálicos

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

sobre la actividad enzimática de endoglucanasa mostrando un aumento entre 15-30% al añadir 10mM, Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} .

Por otra parte, Mihajlovski et al., 2015, analizó la influencia de los iones metálicos en la actividad enzimática de exoglucanasas y endoglucanasas producidas por *Paenibacillus Chitinolyticus*. Mihajlovski et al., 2015, determinó que los iones K^+ (KCl) aumentaban tres veces el valor de la actividad enzimática exoglucanasa, mientras que los iones Ca^{2+} ($CaCl_2$) disminuían la actividad enzimática en la misma cantidad. Para la endoglucanasa, determinó que la adición de 1mM de Ca^{2+} aumentó cinco veces la actividad enzimática.

Por otra parte, Kumar et al., 2019, estudió el efecto de varios iones metálicos sobre la actividad enzimática de una endoglucanasa producida por *Escherichia coli*. Los resultados mostraron un aumento en la actividad enzimática al añadir Ca^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} y Mn^{2+} 1 Mm y una disminución añadiendo Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} . La mejora en la actividad enzimática es atribuida al mantenimiento de la arquitectura enzimática.

4.5. Purificación de las celulasas

El proceso de purificación enzimática se realiza con el fin de optimizar la actividad específica enzimática de la proteína. Dehghanikhah et al., 2020, evaluó la actividad enzimática de la celulasa producida por *Bacillus subtilis*, antes y después del proceso de purificación. Realizó un tratamiento de precipitación usando sal de sulfato de amonio al 85% (p/v), seguido de diálisis y cromatografía de filtración en gel.

Por su parte, Thankappan et al., 2018 realizó purificación parcial a una endoglucanasa producida por bacterias del género *Bacillus*. Elaboró una mezcla de la enzima cruda saturada con sulfato de amonio y la mantuvo a $-40^{\circ}C$ durante toda la noche, para que esta precipitará.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Posteriormente recogió los precipitados mediante un proceso de centrifugación y los disolvió en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,0) para medir la actividad enzimática luego de la purificación.

Asimismo, Liu et al., 2018 realizó un proceso de purificación utilizando un sistema bifásico acuoso de NaCl. Para esto, utilizó polietilenglicol (PEG) al 50% (p/p), tampón fosfato al 40% (p/p), 2 ml de sobrenadante de cultivo celular en tampón citrato 50 mM (pH 6,0) y NaCl. Seguidamente, colocó la mezcla en una centrífuga cónica de tubos. Después de agitar durante 5 minutos, centrifugó el tubo durante 3 min para separar las fases y ensayar la actividad enzimática de la enzima purificada en la fase acuosa.

4.6. Aplicaciones

Las celulasas microbianas han sido estudiadas por su función como biocatalizadores, esto es debido a que le confiere características atractivas para su uso en diversas aplicaciones en la industria (Sharma et al., 2016). La aplicación más conocida y por la cual muchos autores se han dedicado a la investigación de las celulasas es la bioconversión de material lignocelulósico para la producción de bioetanol (Rajeev K. Sukumaran et al., 2005).

Singh et al., 2007, destaca los usos de las celulasas en la industria de la pulpa y el papel. Donde son usadas como aditivos para mejorar la producción y las propiedades físicas del papel, así como la resistencia de la fibra.

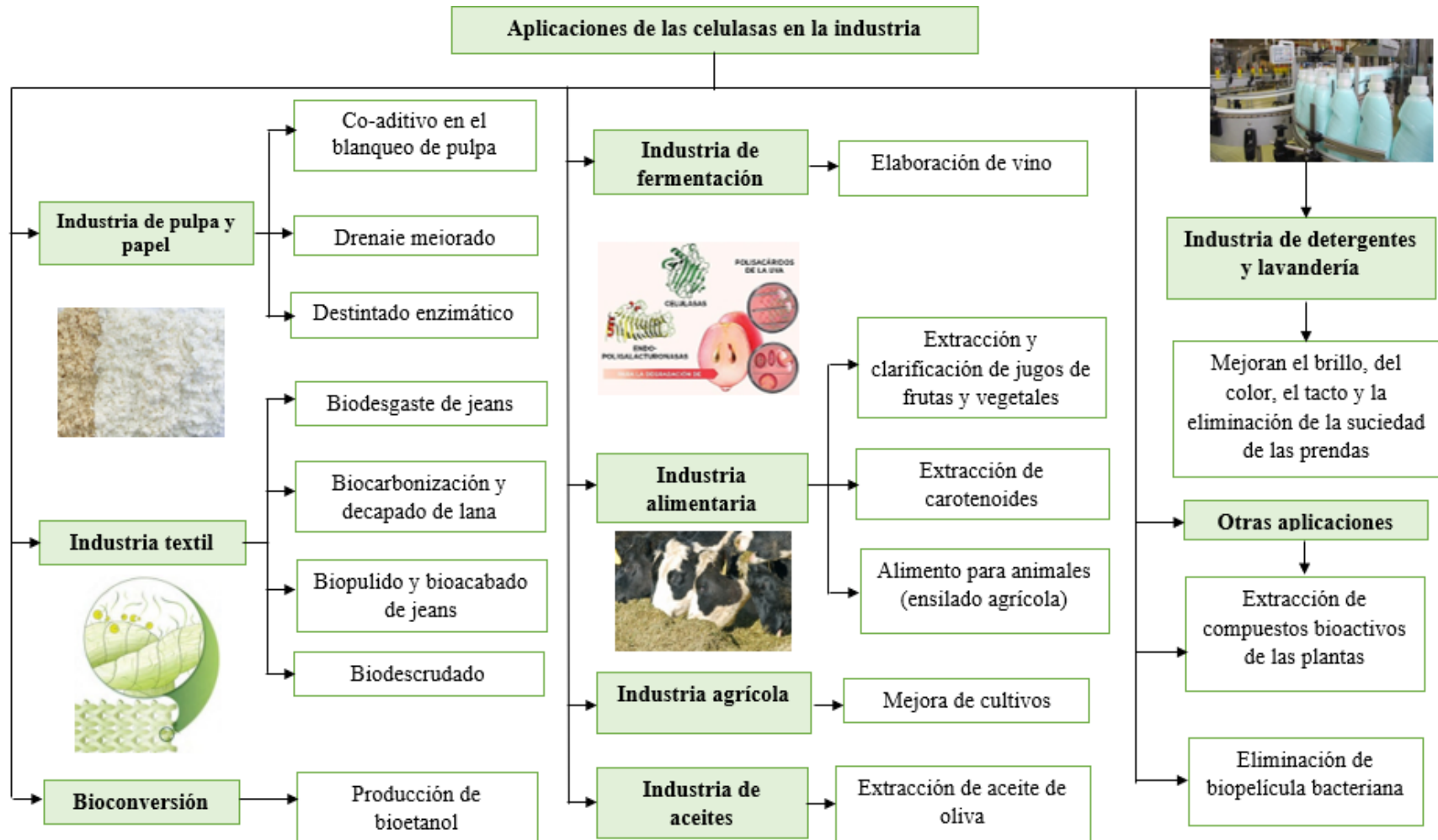
Por otro lado, las celulasas también han sido importantes en la industria textil, alimenticia, agrícola, fermentación, extracción de aceites, entre otros (Fantozzi et al., 1977; Galante et al., 1998; Godfrey & West, 1996; Hebeish & Ibrahim, 2007; Rajeev K. Sukumaran et al., 2005).

En la figura 9 se describen brevemente los resultados de aplicaciones de celulasas en la industria, igualmente en el Apéndice G se presenta esta información más detallada.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Figura 9

Aplicaciones de las celulasas en la industria



5. Conclusiones

Se identificaron 27 géneros de bacterias con potencial para producir enzimas celulasas y sus condiciones óptimas de crecimiento. Entre estas, el género más destacado fue *Bacillus*, seguido por *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Clostridium* y *Enterobacter*. El medio utilizado con mayor frecuencia fue el Medio Bushnell Hass (BHM), utilizado principalmente para el crecimiento de *Bacillus* y *Pseudomonas*.

Las técnicas cualitativas y cuantitativas más empleadas para determinar la actividad enzimática fueron la prueba de Rojo Congo y el Método DNS, respectivamente. La purificación enzimática de celulasas se realizó comúnmente por precipitación con sulfato de amonio a altas concentraciones, seguido de técnicas como diálisis y cromatografía en gel.

Las aplicaciones de enzimas celulasas en la industria son amplias. Las más mencionadas se encuentran en la producción de biocombustibles, la industria textil y la industria de pulpa y papel.

Referencias

- Adıgüzel, A. O., & Tunçer, M. (2017). Production, purification, characterization and usage of a detergent additive of endoglucanase from isolated halotolerant *Amycolatopsis cihanbeyliensis* mutated strain Mut43. *Biocatalysis and Biotransformation*, 35(3), 197–204. <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1315106>
- Ahmad, T., Sharma, A., Gupta, G., Mansoor, S., Jan, S., Kaur, B., Paray, B. A., & Ahmad, A. (2020). Response surface optimization of cellulase production from *Aneurinibacillus aneurinilyticus* BKT-9: An isolate of urban Himalayan freshwater. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(9), 2333–2343. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.04.036>
- Ahmed, A. A. Q., Babalola, O. O., & McKay, T. (2018). Cellulase- and Xylanase-Producing Bacterial Isolates with the Ability to Saccharify Wheat Straw and Their Potential Use in the Production of Pharmaceuticals and Chemicals from Lignocellulosic Materials. *Waste and Biomass Valorization*, 9(5), 765–775. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9849-5>
- Alcalá, U. (2013). Electroforesis SDS. *Chem Evol*, 1–5. http://www3.uah.es/jcdiez/biologia_sanitaria/metodos_biologia_molecular/practicas.pdf
- Almuharef, I., Rahman, M. S., & Qin, W. (2020). High Production of Cellulase by a Newly Isolated Strain *Paenibacillus* sp. IM7. *Waste and Biomass Valorization*, 11(11), 6085–6094. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00832-5>
- Azadian, F., Badoei-dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A., Karami, Z., & Hassanshahian, M. (2017). Production and characterization of an acido-thermophilic, organic solvent stable cellulase from *Bacillus sonorensis* HSC7 by conversion of lignocellulosic wastes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.005>

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

- Barrera, Ó., & Zafra, C. (2018). *Key Factors in Bioremediation Processes for the Wastewater Treatment. a Review*. <https://doi.org/10.31910/rudca.v21.n2.2018.1037>
- Barrero Laura. (2016). Microbiología clínica. In *Universidad Europea de Madrid* (Vol. 1). <https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773185.pdf>
- Barroso Casillas, M. (2010). Pretratamiento De Biomasa Celulosica Para La Obtención De Etanol En El Marco De Una Biorrefineria. *Universidad Politécnica de Madrid*, 117.
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18, 355–383.
- Chander Kuhad, R., Mehta, G., Gupta, R., & Sharma, K. K. (2010). Fed batch enzymatic saccharification of newspaper cellulose improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*, 34(8), 1189–1194. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.03.009>
- Chantarasiri, A. (2015). Aquatic *Bacillus cereus* JD0404 isolated from the muddy sediments of mangrove swamps in Thailand and characterization of its cellulolytic activity. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 41(3), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2015.08.003>
- Chen, S., Sun, S., Zhong, C., Wang, T., Zhang, Y., & Zhou, J. (2020). Bioconversion of lignocellulose and simultaneous production of cellulase, ligninase and bioflocculants by *Alcaligenes faecalis*-X3. *Process Biochemistry*, 90(August 2019), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.008>
- Cortes Ortiz, W. (2014). Tratamientos Aplicables a Materiales Lignocelulósicos para la Obtención de Etanol y Productos Químicos. *Revista de Tecnología*, 13(1), 39–44.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

<https://doi.org/10.18270/rt.v13i1.1297>

Cruz C., N., Castellanos S., D., & Argüello A., H. (2011). Degradación de celulosa y xilano por microorganismos aislados de dos tipos de compost de residuos agrícolas en la Sabana de Bogotá. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 3(2), 237–249. <https://doi.org/10.17584/rcch.2009v3i2.1215>

da Silva, R. N., Melo, L. F. de A., & Luna Finkler, C. L. (2021). Optimization of the cultivation conditions of *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01 for cellulase production. *Biotechnology Reports*, 29. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00599>

Dantur, K. I., Enrique, R., Welin, B., & Castagnaro, A. P. (2015). Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. *AMB Express*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0101-z>

Dar, M. A., Pawar, K. D., Chintalchere, J. M., & Pandit, R. S. (2019). Statistical optimization of lignocellulosic waste containing culture medium for enhanced production of cellulase by *Bacillus tequilensis* G9. *Waste Disposal and Sustainable Energy*, 1(3), 213–226. <https://doi.org/10.1007/s42768-019-00016-w>

Dar, M. A., Pawar, K. D., Rajput, B. P., Rahi, P., & Pandit, R. S. (2019). Purification of a cellulase from cellulolytic gut bacterium, *Bacillus tequilensis* G9 and its evaluation for valorization of agro-wastes into added value byproducts. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20(April), 101219. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101219>

Dar, M. A., Shaikh, A. A., Pawar, K. D., & Pandit, R. S. (2018). Exploring the gut of *Helicoverpa armigera* for cellulose degrading bacteria and evaluation of a potential strain for lignocellulosic biomass deconstruction. *Process Biochemistry*, 73(July), 142–153.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.001>

Dienes, D., Egyházi, A., & Réczey, K. (2004). Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. *Industrial Crops and Products*, 20(1), 11–21.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2003.12.009>

Fan, Z. (2014). Consolidated Bioprocessing for Ethanol Production. In *Biorefineries: Integrated Biochemical Processes for Liquid Biofuels* (pp. 141–160). Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59498-3.00007-5>

Fantozzi, P., Petruccioli, G., & Montedoro, G. (1977). *Trattamenti con additivi enzimatici alle paste di oliva sottoposte ad estrazione per pressione unica: influenze delle cultivars, dell'epoca di raccolta e della conservazione.*

Galante, Y. M., DeConti, A., & Monteverdi, R. (1998). Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. In *Biological Control and Commercial Applications* (pp. 311–326).

García Martín, J. F., Sánchez Villasclaras, S., & Bravo Rodríguez, V. (2010). Producción de bioetanol a partir del residuo de la poda de olivo. In *Revista Educación en Ingeniería* (Vol. 10, Issue January).

Gastelum-Arellanez, A., Paredes-López, O., & Olalde-Portugal, V. (2014). Extracellular endoglucanase activity from *Paenibacillus polymyxa* BEb-40: production, optimization and enzymatic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(11), 2953–2965. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1723-z>

Godfrey, T., & West, S. (1996). Textiles. In *Industrial Enzymology* (pp. 360–371).

Gonzales, G., & Castellanos, O. (2003). Alternativas de modificación del método de Somogyi-

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Nelson para la determinación de azúcares reductores a partir de sus posibilidades químicas.

Revista Ingeniería e Investigación, 52(July 2016), 5–17.

Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos.

Revista Iberoamericana de Micología, 32(1), 1–12.

<https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>

Hebeish, A., & Ibrahim, N. . (2007). Impact of frontier sciences on textile industry. In *Colourage* (pp. 41–55).

Herrera, L. (2015). *Microorganismos productores de enzimas hidrolíticas provenientes del oligoqueto antártico*, *Grania sp*. 1–76.

[https://www.researchgate.net/publication/52009038_Analisis_de_incertidumbre_del_tiempo_de_concentracion_en_la_modelacion_de_eventos_de_tormenta%0Ahttps://www.researchgate.net/profile/Jairo_Arturo_Torres-](https://www.researchgate.net/publication/52009038_Analisis_de_incertidumbre_del_tiempo_de_concentracion_en_la_modelacion_de_eventos_de_tormenta%0Ahttps://www.researchgate.net/profile/Jairo_Arturo_Torres-Matallana/publication/52009038_Analisis_de_incertidu)

[Matallana/publication/52009038_Analisis_de_incertidu](https://www.researchgate.net/publication/52009038_Analisis_de_incertidu)

Inar, I. C. (2005). Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids. *Process Biochemistry*, 945–949.

Jayasekara, S., & Ratnayake, R. (2019). Microbial Cellulases: An Overview and Applications.

Cellulose. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84531>

Kamsani, N., Salleh, M. M., Yahya, A., & Chong, C. S. (2016). Production of Lignocellulolytic Enzymes by Microorganisms Isolated from *Bulbitermes sp*. Termite Gut in Solid-State Fermentation.

Waste and Biomass Valorization, 7(2), 357–371.

<https://doi.org/10.1007/s12649-015-9453-5>

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

- Khan, M. U., Usman, M., Ashraf, M. A., Dutta, N., Luo, G., & Zhang, S. (2022). A review of recent advancements in pretreatment techniques of lignocellulosic materials for biogas production: Opportunities and Limitations. *Chemical Engineering Journal Advances*, 10(November 2021), 100263. <https://doi.org/10.1016/j.ceja.2022.100263>
- Kumar, N., Sudan, S. K., Garg, R., & Sahni, G. (2019). Enhanced production of novel halostable recombinant endoglucanase derived from the metagenomic library using fed-batch fermentation. *Process Biochemistry*, 78(January), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.033>
- Lee, C. K., Jang, M. Y., Park, H. R., Choo, G. C., Cho, H. S., Park, S. B., Oh, K. C., An, J. Bin, & Kim, B. G. (2016). Cloning and characterization of xylanase in cellulolytic *Bacillus* sp. strain JMY1 isolated from forest soil. *Applied Biological Chemistry*, 59(3), 415–423. <https://doi.org/10.1007/s13765-016-0179-2>
- Liu, Y., Guo, H., Wu, Y., & Qin, W. (2018). Purification and characterizations of a novel recombinant *Bacillus velezensis* endoglucanase by aqueous two-phase system. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 0–10. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0204-x>
- López-Domínguez, C. M., Ramírez-Sucre, M. O., & Rodríguez-Buenfil, I. M. (2019). Enzymatic hydrolysis of *Opuntia ficus-indica* cladode by *Acinetobacter pittii* and alcohol fermentation by *Kluyveromyces marxianus*: pH, temperature and microorganism effect. *Biotechnology Reports*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00384>
- Mahanta, C., & Venkatesh, T. G. (1998). Damped bistable system driven by colored noise: A digital simulation study. *Physical Review E - Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*, 58(4), 4141–4146.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

<https://doi.org/10.1103/PhysRevE.58.4141>

- Marín Alavarado, R. M. (2007). Caracterización y Expresión Recombinante. *Genome*.
- Martínez-Anaya, C., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., & Folch-Mallol, J. L. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(3–4), 119–131.
- Maryen, A., Vazquez, A., Cabrera, E. C. V., Acevez, A., & Folch, L. (2018). *INTERJOVEN 2018 Conferencia: Degradación de compuestos lignocelulósicos mediante biocatálisis enzimática*.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S. I., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339(1), 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>
- Mihajlovski, K. R., Carević, M. B., Dević, M. L., Šiler-Marinković, S., Rajilić-Stojanović, M. D., & Dimitrijević-Branković, S. (2015). Lignocellulosic waste material as substrate for Avicelase production by a new strain of *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 104, 426–434. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.07.012>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mojsov, K. (2011). Application of enzymes in the textile industry: A review. *II International Congress Engineering, Ecology and Materials in the Processing Industry Jahorina*.
- Moreau, A., Montplaisir, D., Sparling, R., & Barnabé, S. (2015). Hydrogen, ethanol and cellulase

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

- production from pulp and paper primary sludge by fermentation with *Clostridium thermocellum*. *Biomass and Bioenergy*, 72, 256–262.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.10.028>
- Moreno, M. L. O., & Vélez, D. U.-. (2011). Nuevo método para la cuantificación de la actividad endoglucanasa basado en el complejo celulosa-rojo congo. *Orinoquia*, 15(1), 7–15.
- Niju, S., Swathika, M., & Balajii, M. (2019). Pretreatment of lignocellulosic sugarcane leaves and tops for bioethanol production. In *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels* (pp. 301–324). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815936-1.00010-1>
- Niu, Q., Zhang, G., Zhang, L., Ma, Y., Shi, Q., & Fu, W. (2016). Purification and characterization of a thermophilic 1,3-1,4- β -glucanase from *Bacillus methylotrophicus* S2 isolated from booklice. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(5), 503–508.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.10.007>
- Oke, M. A., Anuar, M. S. M., & Simarani, K. (2017). Mixed Lignocellulosic Biomass Degradation and Utilization for Bacterial Cellulase Production. *Waste and Biomass Valorization*, 8(3), 893–903. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9595-0>
- Oni, O. D., Oke, M. A., & Sani, A. (2020). Mixing of *Prosopis africana* pods and corn cob exerts contrasting effects on the production and quality of *Bacillus thuringiensis* crude endoglucanase. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 50(7), 735–744.
<https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1734939>
- Ovando-chacón, S. L., & Waliszewski, K. N. (2005). PREPARATIVOS DE CELULASAS COMERCIALES Y APLICACIONES EN PROCESOS EXTRACTIVOS Commercial cellulases preparations and their applications in extractives processes. *Microbiology*, 21(42),

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

111–120.

Percival Zhang, Y. H., Himmel, M. E., & Mielenz, J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24(5), 452–481.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.003>

Pérez Chabela, M. de L., Soriano Santos, J., Ponce Alquicira, E., & Díaz Tenorio, L. M. (2015). Polyacrylamide gel electrophoresis-SDS as a tool to study myofibrillar proteins. A review.

Nacameh, 15(2), 77–96. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/nacameh/2015v9n2/perez>

Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454(7206), 841–845.

<https://doi.org/10.1038/nature07190>

Sadhu, S., Ghosh, P. K., De, T. K., & Maiti, T. K. (2013). Optimization of Cultural Condition and Synergistic Effect of Lactose with Carboxymethyl Cellulose on Cellulase Production by

<i>Bacillus</i> sp. Isolated from Fecal Matter of Elephant (<i>Elephas maximus</i>). *Advances in Microbiology*, 03(03), 280–288.

<https://doi.org/10.4236/aim.2013.33040>

Saffari, H., Pourbabae, A. A., Asgharzadeh, A., & Besharati, H. (2017). Isolation and identification of effective cellulolytic bacteria in composting process from different sources.

Archives of Agronomy and Soil Science, 63(3), 297–307.

<https://doi.org/10.1080/03650340.2016.1198006>

Scopes, R. K. (2002). Enzyme Activity and Assays. *ELS*, 1–6.

<https://doi.org/10.1038/npg.els.0000712>

Serpa Ibáñez, R. F., & Calderón Rodríguez, A. (2006). EFECTO DE DIFERENTES FUENTES

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

DE NITRÓGENO EN EL CONTENIDO DE CAROTENOIDES Y CLOROFILA DE CUATRO CEPAS PERUANAS DE *Dunaliella salina* Teod. *Ecología Aplicada*, 5(1–2), 93.

<https://doi.org/10.21704/rea.v5i1-2.895>

Shah, S. R. (2013). Chemistry and applications of cellulase in textile wet processing. *Research Journal of Engineering Sciences*, 2, 1–5.

Shajahan, S., Moorthy, I. G., Sivakumar, N., & Selvakumar, G. (2017). Statistical modeling and optimization of cellulase production by *Bacillus licheniformis* NCIM 5556 isolated from the hot spring, Maharashtra, India. *Journal of King Saud University - Science*, 29(3), 302–310.

<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.08.001>

Sharma, A., Tewari, R., Rana, S. S., Soni, R., & Soni, S. K. (2016). Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(8), 1346–1380. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2070-3>

Singh, A., Kuhad, R. C., & Ward, O. P. (2007). Industrial application of microbial cellulases. In *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects* (pp. 345–358). International Publishing House.

Singh, N., Mathur, A. S., Gupta, R. P., Barrow, C. J., Tuli, D. K., & Puri, M. (2021). Enzyme systems of thermophilic anaerobic bacteria for lignocellulosic biomass conversion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 168, 572–590. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.004>

Singh, S., Moholkar, V. S., & Goyal, A. (2014). Optimization of carboxymethylcellulase production from *Bacillus amyloliquefaciens* SS35. *3 Biotech*, 4(4), 411–424. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0169-6>

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

- Siu-Rodas, Y., Calixto-Romo, M. de los A., Guillén-Navarro, K., Sánchez, J. E., Zamora-Briseño, J. A., & Amaya-Delgado, L. (2018). *Bacillus subtilis* with endocellulase and exocellulase activities isolated in the thermophilic phase from composting with coffee residues. *Revista Argentina de Microbiología*, *50*(3), 234–243. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.08.005>
- Sukumaran, R. K., Singhanian, R. R., & Pandey, A. (2005). Microbial cellulases—production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 832–844.
- Sukumaran, Rajeev K., Singhanian, R. R., & Pandey, A. (2005). Microbial cellulases - Production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*, *64*(11), 832–844.
- Tantayotai, P., Pornwongthong, P., Muenmuang, C., Phusantisampan, T., & Sriariyanun, M. (2017). Effect of Cellulase-producing Microbial Consortium on Biogas Production from Lignocellulosic Biomass. *Energy Procedia*, *141*, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.11.034>
- Teather, R. M., & Wood, P. J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, *43*(4), 777–780. <https://doi.org/10.1128/aem.43.4.777-780.1982>
- Vigueras, Gabriel; Figueroa Montero, Arturo; Hernandez Guerrero, M. (2019). *Valorización de Residuos Lignocelulósicos : Materiales , Biomoléculas , Azúcares Fermentables y Enzimas* (Issue Octubre).
- Wiatr, C. L. (1990). Application of cellulase to control industrial slime. In *Enzyme treatment for industrial slime control*.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Xumeng Ge, Chun Chang, Lu Zhang, Shaoqing Cui, Xiaolan Luo, Shengjun Hu, Yusheng Qin, Y.

L. (2018). *Advances in Bioenergy*. Elsevier, 3, 161–213.

Yang, G., Yang, D., Wang, X., & Cao, W. (2021). A novel thermostable cellulase-producing *Bacillus licheniformis* A5 acts synergistically with *Bacillus subtilis* B2 to improve degradation of Chinese distillers' grains. *Bioresource Technology*, 325(January), 124729.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124729>

Yu, H. Y., & Li, X. (2015). Alkali-stable cellulase from a halophilic isolate, *Gracilibacillus* sp. SK1 and its application in lignocellulosic saccharification for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 81, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.05.020>

Zhang, S., Xu, Z., Wang, T., & Kong, J. (2019). Endoglucanase improve the growth of homofermentative *Lactobacillus* spp. in ensilages. *Journal of Biotechnology*, 295(January), 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.02.010>

Zhang, X., & Zhang, Y. P. (2013). *PRODUCTION , AND APPLICATIONS*. 131–146.

Zhang, Y. P., Hong, J., & Ye, X. (2009). *Cellulase Assays*. Humana Press, Totowa, NJ.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Apéndices

Apéndice A.

Tablas de frecuencia para las condiciones de crecimiento bacteriano

CRECIMIENTO BACTERIANO						
Bacteria	Medios de cultivo	Fuente de carbono	Rango [p/v]	Fuente de nitrógeno	Rango [g/L]	Enzima
<i>Paenibacillus sp.</i>	Agar Luria-Bertani (LB)	CMC	[0,5%-2%]	Caseína	[0,1-2]	(CMCasa) Endoglucanasa, Exoglucanasa, B-glucosidasa, papel de filtro (FPasa)
		Avicel	[1%-2%]	Extracto de malta	[1]	
		Celobiosa	[0,1% -1%]	Urea	[1]	
	Medio Berg Minimal Salt (BMS)	Aserrín	[1%]	Cloruro de sodio	[1]	
		Hierbas medicinales	[0,1%]	Extracto de levadura	[1-3]	
<i>Bacillus sp.</i>	Agar Luria-Bertani (LB)	CMC	[0,2%-3%]	Peptona	[0,2-6]	
		Avicel	[1,5%-2%]			
	Medio Bushnell Hass(BHM)	Maltosa	[1%-1,5%]	Extracto de levadura	[0,2-8,38]	
		Fructosa	[1%]			
		Sacarosa	[0,5-1%]			
	Medio mineral	Glucosa	[1%]	Sulfato de amonio	[1]	
		Cáscara de nuez de areca	[1%]			
	Medio Berg Minimal Salt (BMS)	extracto en paja de hierba	[1%]	Cloruro de amonio	[1]	
		cascarilla de trigo	[1%]			
		bagazo de caña de azúcar	[1%]			
<i>Enterobacter</i>	Medio Bushnell Hass(BHM)	CMC	[1%-2,5%]	Sulfato de amonio	[1]	Endoglucanasa (CMcasa)
				Extracto de levadura	[2-5]	
<i>Klebsiella</i>	Medio Berg Minimal Salt (BMS)	CMC	[0,5%-1%]	Triptona	[2]	Endoglucanasa, Exoglucanasa , B-glucosidasa

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

CRECIMIENTO BACTERIANO						
Bacteria	Medios de cultivo	Fuente de carbono	Rango [p/v]	Fuente de nitrógeno	Rango [g/L]	Enzima
	Medio Bushnell Hass(BHM)	Glucosa	[0,2%-1%]			
<i>Escherichia sp</i>	Agar Luria-Bertani (LB)	CMC	[1%-1,5%]	Peptona	[1]	Endoglucanasa (CMcasa)
		Harina de cladodio	[1%]	Extracto de levadura	[1]	
<i>Pseudomonas sp.</i>	Medio Bushnell Hass(BHM)	CMC	[1%-2%]	Extracto de levadura	[2]	Endoglucanasa, B-glucosidasa

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Apéndice B.

Métodos cualitativos para identificar actividad enzimática

Apéndice B1. Rojo Congo

Esta es la técnica cualitativa más reportada en la literatura para la evaluación de actividad enzimática (Moreno & Vélez, 2011). Se basa en el uso de Rojo Congo como indicador de la degradación de β -Dglucano (Teather & Wood, 1982). Durante la incubación, las placas de agar CMC (Carboximetil celulosa) se inundan con Rojo Congo a una concentración entre el 0,2% p/v -0,5% p/v durante un lapso promedio de 20 minutos, posterior a esto se lavan con una solución 0,1 M de NaCl y se analiza si hay aclaramiento en alguna zona de la colonia, lo cual indica la actividad despolimerizante de las endoglucanasas (Moreno & Vélez, 2011) (S. Zhang et al., 2019).

Apéndice B2. Tinción con yodo Gram

Este método consiste en inundar las placas bacterianas anteriormente incubadas en agar, con una solución de yodo Gram por aproximadamente 10 minutos. Para determinar las cepas bacterianas productoras de celulosa mediante un análisis visual. (Chantarasiri, 2015).

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Apéndice C.

Métodos de cuantificación de azúcares reductores

Apéndice C1. Reactivo DNS

Este método involucra la acción de la enzima celulasa sobre el sustrato, para posteriormente determinar los azúcares reductores resultantes utilizando el reactivo de ácido dinitrosalicílico (DNS). Cabe resaltar que el sustrato utilizado va a depender del tipo de celulasa al que se le va a evaluar la actividad enzimática. El procedimiento consiste en añadir una alícuota de sustrato a una alícuota proporcional de la muestra enzimática, Chantarasiri (2015) realizó mediciones de actividad enzimática utilizando concentraciones del 2%, para el CMC y Avicel y 0,1 % para el p-NPG(p-nitrofenol-glucósido). A continuación, la mezcla se incubaba en tampón químico a condiciones determinadas de temperatura y tiempo, luego de la incubación se le añaden entre 0,03 ml y 3 ml de ácido dinitrosalicílico y se dispone a hervir la mezcla en un rango entre los cinco y quince minutos. Finalmente, se utiliza un espectrofotómetro para medir la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm y se realiza una comparación con la curva de glucosa como estándar (Miller, 1959; Yu & Li, 2015).

Apéndice C2. Técnica de Somogyi-Nelson

El método de Somogyi-Nelson es una técnica de cuantificación enzimática de endoglucanasa basada en la medición de los azúcares reductores totales liberados. En este proceso, se debe realizar la incubación en tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 5,0) de una mezcla 0,5 mililitros de sobrenadante de células con CMC al 1% (p/v). Las condiciones de temperatura y tiempo de incubación son 5 0°C y 15 minutos, respectivamente. A continuación, se añaden 0,5 ml de reactivo de Somogyi a la mezcla y se dispone a hervir mediante baño maría durante 40 minutos. Posteriormente, se añade 0,5 ml de reactivo Nelson a la mezcla y se agita levemente. Por último,

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

se mide la absorbancia a una longitud de onda de 610 nm, utilizando agua destilada como estándar (Gonzales & Castellanos, 2003; S. Singh et al., 2014).

La preparación de los reactivos de Somoyi y Nelson se describen en el Apéndice D.

Apéndice C3. Método f-ácido sulfúrico

Liu et al., 2018, emplearon esta técnica para cuantificar los azúcares reductores liberados en el ensayo enzimático de exoglucanasa. Se prepara una mezcla del sobrenadante libre de células con la enzima cruda y el sustrato, avicel. Se añade una cantidad determinada de ácido sulfúrico a la mezcla, seguida de una cantidad de fenol al 5% en agua. La mezcla se incuba a una temperatura de 90 °C por 5 minutos, en un baño de agua estático. Finalmente, se mide la absorbancia a 490 nm mediante un lector de microplacas (Masuko et al., 2005).

Apéndice C4. Método p-nitrofenol

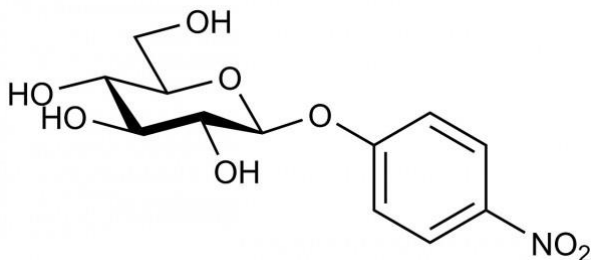
Esta prueba de velocidad de reacción inicial es utilizada para medir la actividad de la β -glucosidasa y está basada en la cuantificación de cantidad liberada de p-nitrofenol empleando p-nitrofenol-glucósido (Figura 10) como sustrato (Y. P. Zhang et al., 2009).

El proceso se basa en la incubación de 0,01 ml de enzima cruda con 0,14 ml de p-nitrofenol-glucósido (p-NPG) en tampón de citrato de sodio 50 mM (pH 4,8). La incubación se efectúa a 55 °C durante 30 minutos. Pasados los 30 minutos, se añade a la mezcla 0,2 ml de tampón de glicina 0,4 M (pH 10,8). Finalmente, se mide la absorbancia de los productos liberados por el p-NPG a una longitud de onda de 430 nm y se calcula la actividad enzimática (Liu et al., 2018).

Figura 10.

Estructura química de p-nitrofenol-glucósido

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS



Nota. Adaptado de (Liu et al., 2018).

Apéndice C5. Prueba de celulasas totales

La actividad de celulasa total incluye la acción sinérgica de endoglucanasas, exoglucanasas y β -D-glucosidasas sobre la celulosa. Los ensayos de actividad celulasa total se miden utilizando sustratos insolubles como el papel de filtro Whatman No. 1 y sustratos que contienen celulosa. El procedimiento está basado en la medición de los azúcares reductores liberados después de aplicar el reactivo DNS (Percival Zhang et al., 2006).

El apéndice E muestra la frecuencia de los métodos encontrados en la investigación, y las actividades enzimáticas encontradas para las diferentes bacterias.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Apéndice D.*Preparación de reactivos Somogyi y Nelson*

A continuación se muestran los procedimientos utilizados para preparar los reactivos de Somogyi – Nelson según (Gonzales & Castellanos, 2003).

Reactivo de Somogyi: Mezclar el componente a) con el componente b) y el volumen total se lleva a 1.000 ml. Período de conservación del reactivo: 2 - 3 meses.

Componente a) Disolver 24 g de carbonato de sodio deshidratado y 12 g de tartrato de sodio y potasio en 250 ml de agua destilada. A esta solución se le añade una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4 g en 40 ml de agua) y finalmente 16 g de NaHCO_3 .

Componente b) Disolver 18 g de Na_2SO_4 en 500 ml de agua caliente (80 °C) y calentar hasta ebullición durante cinco minutos.

Reactivo de Nelson: Disolver 25 g de molibdato de amonio en 450 ml de agua destilada caliente (60°C). Enfriar la solución hasta 5 - 10 °C y añadirle 21 ml de ácido sulfúrico concentrado, que a su vez contiene 3 g de arsenato de sodio. Completar la solución a 500 ml. Incubar a 40°C durante 24 - 48 horas. Si es necesario, puede filtrarse. Período de conservación del reactivo: 2 - 3 meses.

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Apéndice E.*Tablas de frecuencia para ensayos de actividad enzimática***Apéndice E1. Tipos de prueba**

Tipo de ensayo	Ensayo de actividad enzimática	Frecuencia
Cualitativo	Rojo Congo	19
	Tinción con yodo Gram	4
Cuantitativo	Método DNS	50
	Método Somogyi-Nelson	1
	Método Fenol-ácido sulfúrico	3
	Método p-nitrofenol	5

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Apéndice F.

Valores de actividad enzimática en ensayos de celulasas teniendo en cuenta condiciones de sustrato, temperatura y pH.

Género	Especie	Celulasa	Condiciones de ensayo act. Enzimática			Act. Enzimática (U/ml)
			Sustrato	Temperatura [°C]	pH	
<i>Acinetobacter</i>	<i>A. anitratus</i>	Endoglucanasa	CMC	50	4,8	0,23
	<i>A. anitratus</i>	Endoglucanasa	CMC	30	-	0,48
	<i>A. anitratus</i>	Endoglucanasa	CMC	30	-	0,24
	<i>A. pittii</i>	Endoglucanasa	CMC	50	4,8	0,23
<i>Alcaligenes</i>	<i>A. faecalis</i>	Endoglucanasa	CMC	50	5,2	0,12
	<i>faecalis</i>	Endoglucanasa	CMC	50	5,2	0,12
<i>Amycolatopsis</i>	<i>A. cihanbeyliensis</i>	Endoglucanasa	CMC	37	7	5,21
	<i>cihanbeyliensis</i>	Endoglucanasa	CMC	37	7	5,21
<i>Aneurinibacillus</i>	<i>thermoaerophilus</i>	Endoglucanasa	CMC	-	-	22,2
	<i>aneurinilyticus</i>	Endoglucanasa	CMC	37	4,8	1,41
	<i>A. aneurinilyticus</i>	Endoglucanasa	CMC	37	4,8	0,00141
	<i>B. sonorensis</i>	Endoglucanasa	CMC	50	7,5	21,71
<i>Bacillus</i>	<i>B. Velezensis</i>	Endoglucanasa	CMC	55	4,8	28,06
	<i>B. Velezensis</i>	Exoglucanasa	Avicel	55	4,8	16,07
	<i>B. Velezensis</i>	Exoglucanasa	Papel filtro Whiteman No. 1	55	4,8	
	<i>B. Velezensis</i>	β -glucosidasa	p-nitrofenil- β -d-glucopiranosido (pNPG)	55	4,8	ND
	<i>B. cereus</i>	Endoglucanasa	CMC	50	7	1,778
	<i>B. cereus</i>	Exoglucanasa	Avicel	50	7	0,079
	<i>B. cereus</i>	β -glucosidasa	p-nitrofenil- β -d-glucopiranosido (pNPG)	50	7	0,048
	<i>B. sp</i>	Endoglucanasa	CMC	50	6	0,0952
	<i>B. licheniformis</i>	Endoglucanasa	CMC	50	4,8	0,5
	<i>B. licheniformis</i>	Endoglucanasa	CMC	50	4,8	0,493
	<i>sp.</i>	Endoglucanasa	CMC	50	7	192,31
	<i>sp.</i>	Exoglucanasa	Papel filtro Whiteman No. 1	50	7	-
<i>sp.</i>	β -glucosidasa	p-nitrofenil- β -d-glucopiranosido (pNPG)	50	7	-	
<i>B. subtilis</i>	Endoglucanasa	CMC	50	5	-	
<i>sp.</i>	Endoglucanasa	CMC	37	5	120,29	
<i>B. velezensis</i>	Endoglucanasa	CMC	55	4,8	28,06	

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Género	Especie	Celulasa	Condiciones de ensayo act. Enzimática			Act. Enzimática (U/ml)
			Sustrato	Temperatura [°C]	pH	
	<i>B. velezensis</i>	Exoglucanasa	Papel filtro aivcel	55	4,8	16,07
	<i>carboniphilus</i>	Endoglucanasa	CMC	-	-	4168
	<i>methylotrophicus</i>	Endoglucanasa	β -glucano de cebada azul azo	50	6	15,9
	<i>Sp</i>	Endoglucanasa	CMC	50	5	1,624
	<i>Cereus</i>	Endoglucanasa	Celulosa amorfa	50	4,8	0,361
	<i>Cereus</i>	Endoglucanasa	Celulosa amorfa	50	4,8	0,425
	<i>Cereus</i>	Endoglucanasa	Celulosa amorfa	50	4,8	0,176
	<i>Subtilis</i>	Endoglucanasa	CMC	60	4,8	0,519
	<i>Subtilis</i>	Endoglucanasa	CMC	40	5	304,86
	<i>thuringiensis</i>	Endoglucanasa	CMC	50	7	0,138
	<i>B. licheniformis</i>	Endoglucanasa	CMC	50	4,8	13,62
	<i>B. tequilensis</i>	Endoglucanasa	CMC	37	-	14,9
	<i>B. licheniformis</i>	Endoglucanasa	CMC	50	6	22
	<i>B. licheniformis</i>	Exoglucanasa	Avicel	50	6	5
	<i>B. licheniformis</i>	β -glucosidasa	Salicina	50	6	15
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Endoglucanasa	CMC	55	5	0,585
	<i>B. Licheniformis</i>	Endoglucanasa	CMC	50	7	4,81
	<i>B. Licheniformis</i>	Exoglucanasa	Avicel	50	7	-
	<i>B. Licheniformis</i>	β -glucosidasa	PNPG	50	7	0,705
	<i>B. tequilensis</i>	Endoglucanasa	CMC	50	7	4,28
	<i>B. tequilensis</i>	Exoglucanasa	Avicel	50	7	0,061
	<i>B. tequilensis</i>	β -glucosidasa	PNPG	50	7	0,464
	<i>B. subtilis</i>	Endoglucanasa	CMC	35	7	6,25
	<i>sp</i>	Endoglucanasa	CMC	50	6	3,4
	<i>sp</i>	Endoglucanasa	CMC	-	-	3,19
	<i>sp</i>	Exoglucanasa	avicel, fenol y ácido sulfúrico	-	-	2,27
	<i>sp</i>	β -glucosidasa	CMC	-	-	0,31
Cellulomonas	<i>xylanilytica</i>	Endoglucanasa	CMC	50	6	5,21
	<i>C. Thermocellum</i>	Endoglucanasa	CMC	60	5	0,25
	<i>C. beijerinckii</i>	β -glucosidasa	Celobiosa	50	4,8	1151,32
Clostridium	<i>C. beijerinckii</i>	Endoglucanasa	CMC	50	4,8	26,57
	<i>C. thermocellum</i>	Endoglucanasa	CMC	65	6	0,609
	<i>C. thermocellum</i>	Exoglucanasa	Avicel	65	6	0,018
	<i>C. thermocellum</i>	β -glucosidasa	Papel filtro Whiteman No. 1	65	6	-
Consortio Microbiano	<i>Consortio Microbiano</i>	Endoglucanasa	CMC	50	7	0,434

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Género	Especie	Celulasa	Condiciones de ensayo act. Enzimática			Act. Enzimática (U/ml)
			Sustrato	Temperatura [°C]	pH	
	<i>Consorcio Microbiano</i>	Exoglucanasa	Avicel	50	7	0,184
	<i>Consorcio Microbiano</i>	β -glucosidasa	Celobiosa	50	7	3,184
<i>Enterobacter</i>	<i>E. ludwigii</i>	Endoglucanasa	CMC	35	-	1,2
<i>Enterococcus</i>	<i>Faecalis</i>	Endoglucanasa	CMC	50	4,8	0,75
<i>Escherichia</i>	<i>E. Coli</i>	Endoglucanasa	CMC	50	-	120952
<i>Glutamicibacter</i>	<i>Arilaitensis</i>	Endoglucanasa	CMC	37	7,2	1825,35
	<i>sp</i>	Endoglucanasa	CMC	60	8	510,8
	<i>sp</i>	Exoglucanasa	Celobiosa	60	8	218,9
	<i>sp</i>	β -glucosidasa	Pnpg	60	8	315,2
<i>Gracilibacillus</i>	<i>sp</i>	Endoglucanasa	Paja de arroz	60	8	354,1
	<i>sp</i>	Endoglucanasa	Paja de trigo	60	8	257,8
	<i>sp</i>	Endoglucanasa	Rastrojo de maiz	60	8	429,7
	<i>sp</i>	Endoglucanasa	Paja de algodón	60	8	234,6
	<i>Pneumoniae</i>	β -glucosidasa	Celobiosa	45	5,2	0,266
	<i>Pneumoniae</i>	β -glucosidasa	Celobiosa	45	5,2	0,422
<i>Klebsiella</i>	<i>Pneumoniae</i>	β -glucosidasa	Celobiosa	45	5,2	0,197
	<i>sp</i>	Endoglucanasa	CMC	50	5	258,93
	<i>sp</i>	Exoglucanasa	Avicel	40	5	13,41
	<i>Polytrichastri</i>	Endoglucanasa	CMC	-	-	2,71
<i>Mucilaginibacter</i>	<i>Polytrichastri</i>	β -glucosidasa	celobiosa	-	-	5,58
	<i>P. chitinolyticus</i>	Exoglucanasa	Avicel	80	4,8	1,94
	<i>P. chitinolyticus</i>	Endoglucanasa	CMC	80	4,8	0,203
	<i>Validus</i>	Endoglucanasa	CMC	58	5	4,46
<i>Paenibacillus</i>	<i>Validus</i>	β -glucosidasa	Pnpg	58	5	0,54
	<i>P. panacisoli</i>	Endoglucanasa	CMC	37	7	0,52
	<i>P. polymyxa</i>	Endoglucanasa	CMC	50	4,8	0,37
	<i>sp.</i>	Endoglucanasa	CMC	40	7	94,8
<i>Promicromonospora</i>	<i>sp.</i>	β -glucosidasa	p-nitrofenil- β -d-glucopiranosido (pNPG)	40	7	6,6
	<i>Stutzeri</i>	Endoglucanasa	CMC	50	6	4,5
<i>Pseudomonas</i>	<i>Stutzeri</i>	β -glucosidasa	pnpng	50	6	3,3
	<i>aeruginosa</i>	Exoglucanasa	Papel filtro	50	5,8	1,554
	<i>Maltophilia</i>	Exoglucanasa	Papel filtro Whatman no. 1	50	4,8	0,327
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Maltophilia</i>	Exoglucanasa	Papel filtro Whatman no. 1	50	4,8	0,341
	<i>Maltophilia</i>	Exoglucanasa	Papel filtro Whatman no. 1	50	4,8	0,143
<i>Streptomyces</i>	<i>griseorubens</i>	Endoglucanasa	CMC	45	7	78,91
<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	Endoglucanasa	CMC	45	7	-

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Apéndice G.

Aplicaciones industriales de enzimas celulasas

Campo de aplicación	Aplicación	Descripción	Referencia
	Co-adictivo en el blanqueo de pulpa	Las celulasas mejoran la blanqueabilidad de la pulpa kraft de madera blanda y producen una puntuación de brillo final comparable a la del tratamiento con xilanasa	(Bhat, 2000)
Industria de pulpa y papel	Drenaje mejorado	La mezcla de celulasas y hemicelulasas ha sido utilizada para la biomodificación de las propiedades de la fibra. Su objetivo es mejorar el drenaje en las fábricas de papel.	(Dienes et al., 2004)

Destintado
enzimático

Los métodos de destintado convencionales utilizan tensioactivos para flotar el tóner, seguido de la aplicación de altas temperaturas para agregarlo y luego una dispersión para reducir el tamaño. Las celulasas liberan partículas de tóner que facilitan la flotación y los procesos posteriores, disminuyendo el consumo de energía y mejorando las propiedades ópticas y de resistencia del papel.

(Chander
Kuhad et al.,
2010)

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Industria textilBiodesgaste de
jeans

El lavado a la piedra tradicional de los pantalones vaqueros implica la eliminación mediada por amilasa de la capa de almidón (desencolado) y el tratamiento (abrasión) de los pantalones vaqueros con piedra pómez en lavadoras grandes. Durante el proceso de biolavado, las celulasas actúan sobre el tejido de algodón y rompen los pequeños extremos de la fibra en la superficie del hilo, lo que afloja el tinte, que se elimina fácilmente mediante abrasión mecánica en el ciclo de lavado. Las ventajas en el reemplazo de piedra pómez por un tratamiento a base de celulosa incluyen menos daño a las fibras, mayor productividad de las máquinas y menos trabajo intensivo y menos benigno para el medio ambiente

(Rajeev K. Sukumaran et al., 2005)

Biocarbonización
y decapado de
lana

Este método de carbonización es usado para la limpieza de materia celulósica que queda en los tejidos. Los métodos tradicionales utilizaban ácido sulfúrico, lo cual era peligroso, corrosivo e inseguro. Por lo que la carbonización enzimática surgió como una alternativa segura y viable, que además aporta resistencia a la fibra.

(Shah, 2013)

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Biopulido y
bioacabado de
jeans

La mayoría de las prendas de algodón o mezclas de algodón, durante los lavados repetidos, tienden a volverse esponjosas y sin brillo, lo que se debe principalmente a la presencia de microfibrillas parcialmente desprendidas en la superficie de las prendas. El uso de celulasas puede eliminar estas microfibrillas y devolver una superficie lisa y un color original a las prendas.

(Hebeish &
Ibrahim,
2007)

Biodescrudado Es el proceso de eliminación de material no celulósico de la superficie del tejido de algodón con la ayuda de enzimas solas o en combinación. (Mojsov, 2011)

Bioconversión	Producción de bioetanol	<p>La sacarificación enzimática de materiales lignocelulósicos como bagazo de caña de azúcar, mazorca de maíz, paja de arroz, aserrín y residuos forestales mediante celulasas para la producción de biocombustibles es quizás la aplicación más popular que se investiga actualmente.</p>	(Rajeev K. Sukumaran et al., 2005)
----------------------	-------------------------	--	------------------------------------

Industria de fermentación	Elaboración de vino	<p>Los principales beneficios del uso de las celulasas durante la elaboración del vino incluyen una mejor maceración, una mejor extracción del color, una fácil clarificación, una filtración fácil, una mejor calidad del vino y una mayor estabilidad. Las β-glucosidasas pueden mejorar el aroma de los vinos modificando los precursores glicosilados.</p>	(Galante et al., 1998)
----------------------------------	---------------------	---	------------------------

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

**Industria
alimentaria**

Extracción y
clarificación de
jugos de frutas y
vegetales

Las celulasas también tienen una aplicación importante como parte del complejo de enzimas de maceración (celulasas, xilanasas y pectinasas) utilizadas para la extracción y clarificación de jugos de frutas y vegetales para aumentar el rendimiento de los jugos. El uso de enzimas de maceración aumenta tanto el rendimiento como el rendimiento del proceso sin inversión de capital adicional. Las enzimas de maceración se utilizan para mejorar la estabilidad y textura de la nube y disminuir la viscosidad de los néctares y purés de frutas tropicales como mango, melocotón, papaya, ciruela, albaricoque y pera

(Rajeev K.
Sukumaran
et al., 2005)

Extracción de
carotenoides

Los carotenoides han sido empleados como colorantes alimentarios debido a sus propiedades deseables, como su origen natural, nula toxicidad y alta versatilidad. El uso de las enzimas celulasa altera la pared celular de la piel de naranja, la batata y la zanahoria y libera los carotenoides en los cloroplastos y en los fluidos celulares. Estos pigmentos permanecen en su estado natural aún unidos a las proteínas. Esta estructura unida previene la oxidación del pigmento y también afecta la estabilidad del color, mientras que la extracción con solventes disocia los pigmentos de las proteínas y causa insolubilidad en agua y facilidad de oxidación. (Inar, 2005)

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Alimento para animales

El pretratamiento del ensilado agrícola y la alimentación de cereales con celulasas o xilanasas puede mejorar su valor nutricional. Las celulasas se pueden usar para mejorar la producción de ensilaje para la alimentación del ganado, lo que implica mejorar la digestibilidad de los pastos que contienen grandes cantidades de nutrientes y valores energéticos potencialmente digeribles junto con solo pequeñas cantidades de carbohidratos solubles en agua.

(Godfrey & West, 1996)

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

El uso de celulasas como aditivo en el alimento de algunos animales mejora significativamente la tasa de cobertura del alimento, así como su digestibilidad. (Godfrey & West, 1996)

Las vacas alimentadas con preparaciones de celulasas aumentan su producción de leche. (Godfrey & West, 1996)

Industria agrícolaMejora de
cultivos

Las celulasas mejoran el crecimiento de los cultivos y controlar las enfermedades de las plantas. Las celulasas son capaces de degradar la pared celular de los patógenos de las plantas para controlar la enfermedad de las plantas. Las celulasas también se han utilizado para mejorar la calidad del suelo. Tradicionalmente, la incorporación de paja se considera una estrategia importante para mejorar la calidad del suelo y reducir la dependencia de los fertilizantes minerales

(Bhat, 2000)

PRODUCCIÓN BACTERIANA DE CELULASAS

Industria de aceites

Extracción de aceite de oliva

La termo estabilidad enzimática de algunas celulasas ha sido empleada para obtener altos rendimientos en el proceso de extracción de aceite de oliva.

(Fantozzi et al., 1977)

Industria de detergentes y lavandería

Las celulasas son utilizadas en detergentes para modificar las fibrillas de celulosa pueden mejorar el brillo del color, el tacto y la eliminación de la suciedad de las prendas de mezcla de algodón.

(R. K. Sukumaran et al., 2005)

Extracción de compuestos bioactivos de las plantas	Las celulasas mejoran la liberación de bioactivos de las células. La extracción de bioactivos ayudada por enzimas proporciona un proceso sencillo y amigable con el medio ambiente.	(N. Singh et al., 2021)
--	---	-------------------------

Otros

Eliminación de biopelícula bacteriana	La unión de enzimas celulasas, amilasas y proteasas ha servido para prevenir la formación de biopelículas en superficies sólidas.	(Wiatr, 1990)
---------------------------------------	---	---------------
