

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES.

3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

En el presente trabajo, se utilizó el microorganismo *Actinomyces naeslundii*, el cual fue aislado en el Instituto de Microbiología y Biotecnología "Simón Pérez Alva" de la UNMSM, a partir de una muestra de suelos naranjales de la localidad de Huaral, distrito de Huando, del departamento de Lima, e identificado en el Instituto Nacional de Salud (INS)(ANEXO A).

3.1.2 MEDIOS DE CULTIVO:

a).Medios de cultivo complejos:

- **Cultivo en sólido:** Constituido por Agar Trypticasa Soya y Agar Trypticasa Soya, suplementado con 1% de pectina cítrica.
- **Cultivo en líquido:** Constituido por Caldo Trypticasa Soya y Caldo Trypticasa Soya suplementado con 1% de pectina cítrica.

b).Medio de cultivo experimental:

Constituido por sales minerales y cáscara de naranja como única fuente de carbono, variando sus concentraciones de acuerdo al siguiente cuadro:

COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO EXPERIMENTAL

	NUTRIENTES	CONCENTRACIÓN MÍNIMA (g/L)	CONCENTRACIÓN MÁXIMA (g/L)
X ₁	Cáscara. de naranja	2.000	16.700
X ₂	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.000	5.000
X ₃	ÚREA	0.700	5.000
X ₄	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.013	0.080
X ₅	CaCl ₂	0.020	0.083
X ₆	NaCl	1.000	5.000
X ₇	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.200	1.000
X ₈	Na ₂ CO ₃	0.800	4.000

3.1.3. MATERIALES:

Mechero

Asa de Kolle

Termómetro

Cronómetro

Erlenmeyers de 250 mL

Beakers de 150, 250, 500, 1000 mL

Pipetas de 1, 2, 5, 10, 25 mL

Probetas de 100, 250, 500, 1000 mL

Baguetas

Tubos de ensayo de 15 * 150 mm.

Placas petri

Embudos de vidrio

Kitasato

Tips de 50, 1000, 5000 µL.

Parafilm

Algodón

Pinzas

Gradillas

Filtro gelman 0.2 μ M

Bomba de aire de 500 mL / min (URANUS)

3.1.4. REACTIVOS:

Medio Agar Trypticosa Soya (TSA)

Medio Caldo Trypticosa Soya (TSB)

Úrea

Sulfato de magnesio

Cloruro de calcio

Solución amortiguadora (buffer) de fosfato 0.05 M, pH 7

Ácido sulfúrico q.p.

Hidróxido de sodio

Alcohol etílico de 96 °

Agar-agar

Solución amortiguadora (buffer) de acetato 0.05 M, pH 4.8

Solución de pectina al 1%

Reactivo de Ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959)

Estándar de Ácido D-galacturónico para análisis (SIGMA)1 mg /mL

Sulfato de amonio

Tartrato de sodio y potasio

Estándar de Albúmina sérica de bovino 10 mg / mL

Pectina (sigma)

Pectina cítrica de grado alimentario

Cáscaras de naranja

Sulfato ferroso

Cloruro de sodio

Rojo de rutenio

3.1.5. EQUIPOS

Autoclave

Biorreactor de 1 litro

Espectrofotómetro de rango visible SPECTRONIC 20

Estufa con temperatura controlada a 37 ° C MEMMERT S 30

Baño maría con temperatura controlada a 37 °C INSTRUMENTAL.

Horno a 180 ° C

Centrífuga

Agitador a 200 r.p.m.

Cocinilla

Refrigeradora

Balanza analítica

Balanza de platillos

Bomba de vacío

Vortex

Equipo de destilación

Micro pipetas de 50, 1000, 5000 µL

3.2. MÉTODOS

3.2.1. ACONDICIONAMIENTO DEL MICROORGANISMO (Cabello y col.,1982).

El microorganismo que utilizamos en esta investigación fue sembrado periódicamente, tanto en un medio sólido como en el líquido, de la siguiente manera:

- Se sembró una colonia de *Actinomyces naeslundii* en un tubo con Caldo Trypticasa Soya, suplementado con 1% pectina cítrica, y luego se incubó durante 5 días a 37 ° C.

- A continuación, se realizó una siembra del medio líquido en Agar Trypticasa Soya, suplementado con 1% pectina cítrica, y se realizó la incubación durante 3 días a 37 ° C.
- Posteriormente, se repitieron los pasos anteriores por 60 días.

3.2.2. EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LOS PARÁMETROS pH, TEMPERATURA Y AIREACIÓN-AGITACIÓN EN UN MEDIO SINTÉTICO, PARA LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS.

a) DETERMINACIÓN DEL pH ÓPTIMO (Becker y col.,1999).

En primer lugar, el microorganismo fue Inoculado en caldos de TSB, amortiguados a tres pH (5, 7 y 8.5); a continuación, se incubó en estufa a 37 °C por 72 horas; y, finalmente, se midió la masa celular por espectrofotometría a 600 nm.

b) DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA (Becker y col.,1999).

En el presente caso, se siguió el siguiente procedimiento:

- Inoculación del microorganismo en caldos de TSB
- Incubación de los tubos los tubos a temperaturas de 28°C, 37°C y 45 °C durante 72 horas
- Medición de la masa celular, por espectrofotometría a 600 nm.

c) DETERMINACIÓN DE LA AIREACIÓN-AGITACIÓN (Becker y col.,1999).

La aireación-agitación se evaluó a las 72 horas de incubación, a 37 °C, comparando el aumento de la masa microbiana por espectrofotometría, a 600 nm de los tubos con caldo control de TSB, en dos condiciones experimentales:

- Tubos con sello de parafina estéril y sin agitación (SIN aireación-agitación)
- Tubos sin sello de parafina estéril y con agitación (CON aireación-agitación)

3.2.3. CONDICIONES DEL PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN:

a) ACONDICIONAMIENTO DEL SUSTRATO

Se utilizó cáscara de naranja como sustrato para la biotransformación, la cual tuvo el siguiente tratamiento:

La cáscara de naranja fue recolectada de comerciantes de jugo de naranja cercanos a la UNMSM. Enseguida, se extrajo el aceite de la cáscara de naranja utilizando un equipo de arrastre al vapor; a continuación, la cáscara fue secada a 80 ° C por 24 horas en estufa. Posteriormente, la cáscara de naranja fue triturada en un molino manual de tornillo sin fin y tamizada a un tamaño de partícula menor a 0.5 mm de diámetro

b) MANTENIMIENTO DEL MICROORGANISMO: El microorganismo *Actinomyces naeslundii* se mantuvo por resiembras periódicas en el medio Agar Trypticasa Soya (TSA), suplementado con 1 % de pectina cítrica. Las condiciones de crecimiento del microorganismo fueron de 37 °C durante 24 horas.

c) PREPARACIÓN DEL INÓCULO: El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 24 horas, haciendo diluciones de éste en solución fisiológica estéril, hasta obtener una suspensión de células de 3×10^9 u.f.c./mL. De aquí, se tomaron alícuotas de 45 mL, que se transfirieron a matraces erlenmeyer cuyos contenidos fueron de 150 mL.

d) DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO EXPERIMENTAL : El medio de cultivo estuvo representado por nutrientes ubicados dentro de un rango mínimo-máximo:

**CUADRO 3.
COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO EXPERIMENTAL**

	NUTRIENTES	CONCENTRACIÓN MÍNIMA (g/L)	CONCENTRACIÓN MÁXIMA (g/L)
X ₁	Cáscara de naranja	2.000	16.700
X ₂	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.000	5.000
X ₃	ÚREA	0.700	5.000
X ₄	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.013	0.080
X ₅	CaCl ₂	0.020	0.083
X ₆	NaCl	1.000	5.000
X ₇	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.200	1.000
X ₈	Na ₂ CO ₃	0.800	4.000

Estos componentes fueron evaluados en una plantilla estadística de Plackett-Burman, de donde se obtuvo los nutrientes más significativos para la producción de enzimas pectinasas.

e). OBTENCIÓN DE PECTINASAS: La obtención del extracto enzimático crudo fue realizada por centrifugación, a 5000 rpm por 20 minutos de las muestras constituidas por 5mL de cultivo, tomadas cada 8 horas, durante 7 días.

3.2.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS:

a) DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA: La Actividad enzimática del extracto obtenido luego de la biotransformación, fue evaluada por la liberación de azúcares reductores de la pectina (1% p/v pectina sigma); la cual fue medida colorimétricamente, con el reactivo ácido 3,5 - dinitrosalicílico (DNS). Se realizó una curva estándar de ácido D-galacturónico al 1% preparado en solución amortiguadora de acetato 0.1M y pH 4.8 (Miller y col., 1959) teniendo en cuenta que una unidad enzimática se definió como la

cantidad de enzima que liberó $1\mu\text{M}$ de ácido D-galacturónico por minuto a 50°C (ANEXO M).

b) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA: Fue utilizada la técnica de recuento en placa de células viables, para lo cual se tomaron alícuotas del cultivo cada 8 horas (1 mL); luego, se realizó diluciones seriadas, para colocar 0.1 mL de células diluidas en la superficie de una placa TSA, extendiéndose éstas, con una asa de Drigalski, e incubadas, finalmente, a 37°C (ANEXO C).

3.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

a) ANÁLISIS Y SELECCIÓN DE NUTRIENTES MÁS INFLUYENTES EN LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS.

En una primera etapa de análisis se utilizó el diseño experimental de Plackett-Burman para identificar los nutrientes de mayor influencia en la producción de pectinasas, esto permitió evaluar 8 variables en 12 experimentos con 2 réplicas, teniendo en cuenta una concentración alta (+1) y una baja (-1) de cada uno de los nutrientes. La evaluación de los mismos, se realizó en frascos erlenmeyers de 250 mL de capacidad, que contenían 150 mL de medio experimental.

CUADRO 4.
PLANTILLA DE PLACKETT BURMAN (Ayala y Pardo,1995)

N	VARIABLES							
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈
1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1
2	1	-1	1	1	-1	-1	1	1
3	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
4	1	1	1	-1	-1	1	1	-1
5	1	1	-1	-1	1	-1	1	1
6	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1
7	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1
9	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1
10	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1
11	-1	1	1	1	1	1	-1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Donde:

X₁= Cáscara de naranja.

X₅= CaCl₂

X₂= (NH₄)₂SO₄

X₆= NaCl

X₃= (NH₂)₂CO

X₇= MgSO₄

X₄= FeSO₄*7H₂O

X₈= Na₂CO₃

b) OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NUTRIENTES PARA LA MÁXIMA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS.

Se utilizó el Diseño de Box – Benhken, el cual sirvió para determinar las concentraciones óptimas de cada variable independiente (X₁= Cáscara de naranja; X₂= (NH₄)₂ SO₄ y X₄= FeSO₄. 7H₂O), para la máxima producción de pectinasas, diseño que fue complementado con la técnica de análisis de respuesta superficial a las variables independientes anteriores, para luego ajustarlas al modelo polinomial cuadrático siguiente:

$$Z=b_0+b_1*X_1+b_2*X_2+b_3*X_4+b_4*X_1*X_2+b_5*X_1*X_4+b_6*X_2*X_4+b_7*X_1^2+b_8*X_2^2+b_9*X_4^2$$

Donde:

Z = Variable dependiente (Producción de enzima)

X₁= Cáscara de naranja. X₂= (NH₄)₂SO₄. X₄= FeSO₄*7H₂O.

b₀ = Constante por determinar

b₁, b₂, b₃ = Coeficientes lineales por determinar

b₄, b₅, b₆, b₇, b₈, b₉ = Coeficientes cuadráticos por determinar

CUADRO 5.

PLANTILLA DE BOX BENHKEN (Robles y Col. 1995)

N	VARIABLES		
	X ₁	X ₂	X ₄
1	1	1	1
2	1	-1	-1
3	1	1	0
4	1	0	-1
5	1	0	-1
6	1	-1	0
7	-1	1	1
8	-1	1	-1
9	-1	0	0
10	-1	0	-1
11	-1	0	1
12	-1	1	0
13	0	1	-1
14	-1	-1	-1
15	0	0	0
16	0	0	0

Para la identificación de un valor óptimo, fue necesario estimar la curvatura de las variables ensayadas, determinándose los coeficientes del modelo polinomial, usando la técnica de regresión múltiple, cuyos valores fueron asignados a las ecuaciones XY polinomiales, para generar respuestas predictivas (representadas en los gráficos de respuesta en superficie y de líneas de contorno).



c) BIOTRANSFORMACIÓN FINAL EN BIORREACTOR.

Con las concentraciones óptimas obtenidas del experimento anterior, se realizó un último experimento, en el cual fueron evaluados el crecimiento microbiano y la actividad enzimática, utilizando para ello un inóculo en fase logarítmica con la finalidad de aprovechar la fuente de carbono en el mantenimiento del microorganismo.