

Proceso biotecnológico para la obtención de celulasas bacterianas

Kelly Johana Rodriguez 1; Diana Paola Silva 2; Leidy Yuliana Chavarria 3; Heidy Carolina Bermúdez 4; Kevin Stiven López 5.
Programa de Química aplicada a la industria
Grupo proyecto 39TGQIN

1. Introducción

La producción de enzimas celulolíticas mediante procesos biotecnológicos implica una serie de etapas fundamentales que garantizan la obtención de un bioproducto eficiente. Estas etapas incluyen la preparación y estandarización del inóculo, el desarrollo del proceso fermentativo bajo condiciones controladas, la recuperación del producto mediante técnicas de separación y, finalmente, su caracterización fisicoquímica y microbiológica (Bhardwaj et al., 2021; Malik et al., 2021). Durante la fermentación, los microorganismos, especialmente bacterias del género *Bacillus*, utilizan sustratos ricos en celulosa como fuente de carbono, induciendo la síntesis de enzimas extracelulares capaces de degradar materiales lignocelulósicos (Dobrzyński et al., 2022; Ilić et al., 2023; Pham et al., 2022). Este tipo de procesos ha cobrado gran relevancia debido a su aplicación en la valorización de residuos agroindustriales y en el desarrollo de bioproductos sostenibles (Ghazanfar et al., 2021; Jayasekara & Ratnayake, 2019; Rajesh & Gummadi, 2022).

Las celulasas son enzimas que presentan propiedades fisicoquímicas específicas, tales como actividad en rangos moderados de pH (generalmente entre 5 y 7) y temperaturas óptimas cercanas a 40–60 °C, dependiendo del microorganismo productor (Malik & Javed, 2024; Malik & Javed, 2021; Pham et al., 2022). Estas enzimas actúan de manera sinérgica mediante complejos enzimáticos que incluyen endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas, permitiendo la hidrólisis de la celulosa en azúcares simples (Bhardwaj et al., 2021; Jayasekara & Ratnayake, 2019). En el ámbito industrial, las celulasas tienen múltiples aplicaciones, destacándose su uso en la extracción de pectinas a partir de residuos vegetales, donde facilitan la ruptura de la matriz estructural de la pared celular, mejorando el rendimiento del proceso y reduciendo el uso de agentes químicos (de Souza & Kawaguti, 2021; Ejaz et al., 2021; Hussain et al., 2025).

El objetivo del presente estudio fue producir enzimas celulolíticas a partir de un microorganismo previamente aislado de cáscaras de naranja, mediante un proceso de fermentación en medio Mandels suplementado con carboximetilcelulosa como sustrato inductor. Para ello, se llevó a cabo la preparación y escalamiento del inóculo, el control de variables durante la fermentación, la recuperación del bioproducto y su posterior caracterización fisicoquímica y microbiológica, siguiendo estrategias reportadas para *Bacillus spp.* en medios con CMC como inductor (Dobrzyński et al., 2022; Malik et al., 2021; Pham et al., 2022). De esta manera, se evaluó la capacidad del sistema para generar actividad enzimática y degradar el sustrato celulósico, evidenciando el potencial del uso de residuos agroindustriales en procesos biotecnológicos (Ghazanfar et al., 2021; Ilić et al., 2023; Rajesh & Gummadi, 2022).

2. Materiales y métodos

2.1 Fermentación para la obtención de celulasas bacterianas

El proceso fermentativo se llevó a cabo utilizando un medio Mandels suplementado con carboximetilcelulosa (CMC) como fuente de carbono, con el fin de inducir la producción de

enzimas celulolíticas. Como inóculo se empleó un microorganismo previamente aislado a partir de cáscaras de naranja en prácticas anteriores, el cual fue reactivado y escalado bajo condiciones controladas.

Para la obtención del inóculo, se utilizó caldo BHI (Brain Heart Infusion) como medio de crecimiento. Inicialmente, se preparó un volumen total de 55 mL de medio, distribuido en dos tubos de ensayo con 5 mL cada uno y un frasco con 45 mL, los cuales fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El preinóculo se obtuvo mediante la siembra de colonias previamente aisladas en los tubos con 5 mL de medio, los cuales fueron incubados a 37 °C durante 24 a 48 horas. Posteriormente, el cultivo fue transferido al frasco con 45 mL de medio, obteniéndose un inóculo de 50 mL que fue incubado a 37 °C durante 48 horas.

El inóculo fue posteriormente escalado hasta un volumen de 250 mL y estandarizado mediante comparación con la escala de McFarland hasta alcanzar el patrón 4, equivalente aproximadamente a 1.2×10^9 UFC/mL, garantizando una adecuada carga microbiana para el proceso fermentativo.

La fermentación se realizó inoculando 250 mL del cultivo en 550 mL de medio Mandels estéril, obteniendo un volumen total de 800 mL. El proceso se llevó a cabo en un agitador tipo shaker bajo condiciones controladas de temperatura de 37 °C y agitación constante a 150 rpm.

Durante el tiempo cero (Hora 0) se registraron parámetros fisicoquímicos iniciales como pH y °Brix. A lo largo de la fermentación (72 horas), se tomaron muestras para evaluar el comportamiento del sistema, incluyendo crecimiento microbiano, contenido de azúcares reductores y actividad enzimática. Al finalizar el proceso, se realizó la recuperación del bioproducto.

2.2 Control de la fermentación

Para el seguimiento del bioproceso, se realizaron controles mediante la toma de muestras en condiciones asépticas durante el tiempo cero (Hora 0) y al final del proceso fermentativo (72 horas). Las muestras fueron recolectadas directamente del sistema de fermentación, con el fin de evaluar el comportamiento microbiológico y fisicoquímico del medio a lo largo del proceso.

2.2.1 Control de pureza

La pureza del cultivo fue verificada mediante tinción de Gram. Para ello, se tomaron alícuotas del cultivo, se realizaron extendidos en portaobjetos y se sometieron al procedimiento de tinción correspondiente. Posteriormente, las muestras fueron observadas al microscopio con objetivo de inmersión (100X), confirmándose la presencia de morfologías homogéneas correspondientes a bacilos esporulados Gram positivos y la ausencia de contaminantes.

2.2.2 Concentración de microorganismos

La concentración celular del inóculo fue determinada mediante comparación visual con la escala de McFarland. Se tomaron aproximadamente 2 mL del cultivo y se ajustó la turbidez mediante la adición de solución salina estéril al 0.85% hasta alcanzar el patrón 4, equivalente aproximadamente a 1.2×10^9 UFC/mL, garantizando una carga microbiana adecuada para el proceso fermentativo.

2.2.3 Actividad enzimática

La actividad enzimática fue determinada a partir del extracto obtenido tras centrifugación del cultivo fermentado a 4600 rpm durante 15 minutos a 8 °C. El sobrenadante fue utilizado como fuente de enzimas extracelulares.

Para la reacción enzimática, se adicionaron 750 μL de solución de carboximetilcelulosa (CMC) al 1% en buffer fosfato pH 7.0 y 750 μL del sobrenadante en tubos Eppendorf previamente rotulados. Se preparó un blanco enzimático utilizando 750 μL de buffer fosfato y 750 μL de solución de CMC.

Los tubos fueron incubados en baño termostático a 50 °C durante 30 minutos para permitir la hidrólisis del sustrato. Posteriormente, la reacción fue detenida mediante enfriamiento en baño de hielo durante 5 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 20 minutos a 7 °C para separar los residuos sólidos.

El sobrenadante obtenido fue utilizado para la cuantificación de azúcares reductores mediante el método DNS, permitiendo determinar indirectamente la actividad enzimática.

2.2.4 Contenido de azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores fue determinado mediante el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A partir del sobrenadante obtenido tras la reacción enzimática, se realizaron diluciones seriadas decimales (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) con agua destilada tipo II, con el fin de garantizar que las lecturas de absorbancia se encontraran dentro del rango lineal del método. Para la determinación, en tubos de ensayo debidamente rotulados se adicionaron volúmenes definidos de muestra diluida, agua destilada y reactivo DNS, de acuerdo con el esquema establecido en la guía. Las mezclas fueron sometidas a calentamiento en baño de agua a 100 °C durante 5 minutos para favorecer el desarrollo del color característico producto de la reducción del DNS en presencia de azúcares reductores. Posteriormente, los tubos fueron enfriados a temperatura ambiente.

De cada tubo se tomaron alícuotas de 200 μL , las cuales fueron transferidas a una microplaca de 96 pozos. La absorbancia fue medida a 540 nm en un lector de microplacas.

Las muestras correspondientes al tiempo cero (medio Mandels) y al tiempo final (72 h, sobrenadante) fueron analizadas por triplicado, distribuyéndose en la microplaca para un total de 18 pozos, lo cual permitió mejorar la confiabilidad de los resultados mediante replicación experimental.

La cuantificación de azúcares reductores se realizó mediante una curva patrón de glucosa preparada a partir de una solución madre de 2 g/L, obteniendo concentraciones finales de 0.08, 0.18, 0.28, 0.38, 0.48 y 0.58 g/L. A partir de los valores de absorbancia obtenidos, se interpolaron las concentraciones de las muestras y se corrigieron teniendo en cuenta el factor de dilución aplicado.

2.2.5 pH

El pH del sistema fue medido utilizando un potenciómetro previamente calibrado con soluciones buffer estándar. Las mediciones se realizaron al inicio (Hora 0) y al final del proceso fermentativo, con el fin de evaluar las variaciones asociadas al metabolismo microbiano.

2.3 Recuperación del producto

Finalizada la fermentación, el cultivo fue retirado del sistema de incubación y manipulado bajo condiciones asépticas en cabina de flujo laminar. Se tomó un volumen aproximado de 20 mL del cultivo fermentado para su análisis.

Posteriormente, el cultivo fue sometido a centrifugación a 4600 rpm durante 15 minutos a una temperatura entre 4 y 8 °C, con el fin de separar la biomasa celular del sobrenadante. El

sobrenadante obtenido correspondió al bioproducto, constituido principalmente por el extracto enzimático extracelular, mientras que el pellet fue conservado para análisis microbiológicos. Se registraron las condiciones de operación de la centrifuga, así como el volumen aproximado de bioproducto recuperado. El sobrenadante fue recolectado en recipientes estériles debidamente rotulados y almacenado bajo refrigeración para su posterior caracterización.

2.3.1 Cosecha

Se realizó una única cosecha del bioproducto al final del proceso fermentativo. El cultivo fue sometido a centrifugación a 4600 rpm durante 15 minutos a 8 °C, con el fin de separar la biomasa celular del sobrenadante. El sobrenadante obtenido fue recuperado bajo condiciones asépticas y almacenado para su posterior análisis, mientras que el pellet celular fue separado y conservado para la verificación de pureza y el control microbiológico del sistema al final de la fermentación.

2.4 Caracterización del bioproducto

2.4.1 Caracterización fisicoquímica del bioproducto

La caracterización fisicoquímica del bioproducto incluyó la determinación del pH y del contenido de azúcares reductores. El pH fue medido empleando un potenciómetro previamente calibrado con soluciones buffer estándar, registrando los valores correspondientes al final de la fermentación.

El contenido de azúcares reductores fue determinado mediante el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), siguiendo el procedimiento descrito previamente. Esta determinación permitió evaluar la cantidad de azúcares liberados como resultado de la actividad enzimática del sistema. La cuantificación se realizó mediante la interpolación de las lecturas de absorbancia en una curva patrón de glucosa previamente establecida.

De manera complementaria, se realizó una medición preliminar de sólidos solubles totales mediante refractometría, con el fin de estimar la concentración global de solutos presentes en el extracto. Este análisis permitió obtener una referencia inicial del contenido de azúcares, la cual fue posteriormente complementada mediante la determinación específica de azúcares reductores por el método DNS.

Adicionalmente, se realizó una evaluación cualitativa del bioproducto, considerando aspectos como coloración, turbidez y apariencia general del sobrenadante.

2.4.2 Caracterización microbiológica del bioproducto

La caracterización microbiológica del bioproducto se realizó a partir del pellet obtenido tras la centrifugación. Se efectuó una tinción de Gram para verificar la pureza del cultivo al final del proceso fermentativo, observando la morfología celular mediante microscopía con objetivo de inmersión (100X).

De manera complementaria, se realizaron siembras en medios de cultivo apropiados mediante técnica de estría, con el fin de evaluar la presencia de microorganismos contaminantes. Los cultivos fueron incubados a la temperatura correspondiente y posteriormente analizados.

La ausencia de crecimiento de microorganismos diferentes al cultivo inicial, junto con la homogeneidad morfológica observada, permitió confirmar la calidad microbiológica del bioproducto obtenido.

3. Resultados y Discusión

3.1 Control de variables del bioproceso

Con el propósito de evaluar el comportamiento del sistema durante la fermentación celulolítica, se realizó el seguimiento de variables operacionales, fisicoquímicas y microbiológicas a lo largo del proceso. Estos parámetros permiten analizar la estabilidad del sistema y la respuesta del microorganismo frente a las condiciones establecidas, tales como temperatura, agitación, pH y crecimiento celular.

En la **Tabla 1** se presentan los resultados obtenidos durante las diferentes etapas de la fermentación, incluyendo el tiempo cero (inicio del proceso) y el tiempo final del proceso (72 horas).

Tabla 1 Resultados de control de variables de la fermentación

Tiempo de la fermentación (h)	rpm	Temperatura (°C)	Pureza	Microorganismos (UFC/mL) Escala McFarland	Actividad enzimática (U/mL)	Azúcares (mg/mL)	pH
0	150	37	Puro	1.2×10^9	—	—	6.52
24	150	37	Puro	—	—	—	6.51
48	150	37	Puro	—	—	—	6.53
72	150	37	Puro	2.1×10^{10}	Max. 8.938	8.97	6.73

Aunque se detectaron valores de actividad enzimática en el tiempo inicial, estos no corresponden al proceso fermentativo, sino que pueden estar asociados al inóculo o a interferencias del medio. La actividad enzimática atribuible al bioproceso se evidenció principalmente a las 72 horas, alcanzando valores cercanos a 8.938 U/mL.

Figura 1. Variables del proceso de fermentación



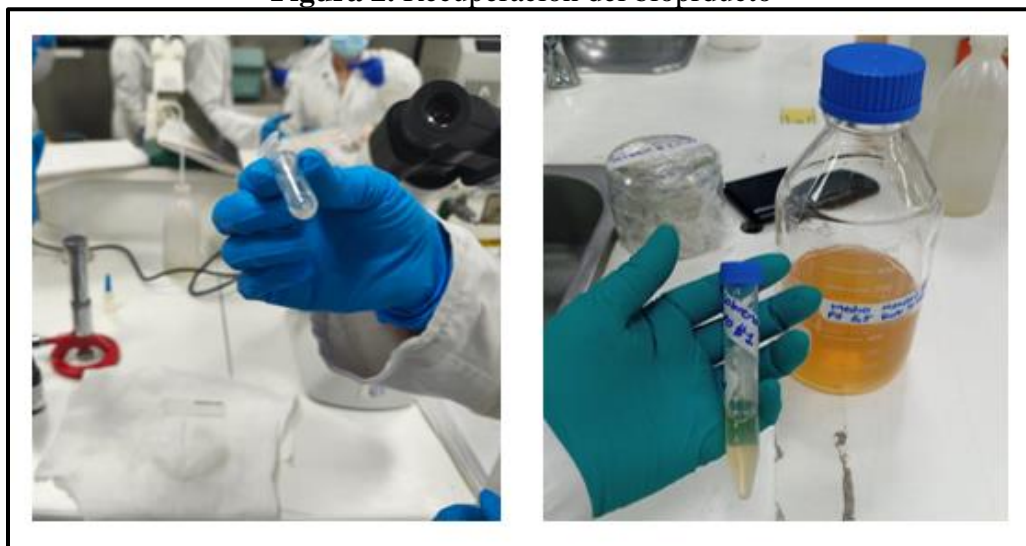
En la **Figura 1** se puede observar la fermentación celulolítica desarrollada en el shaker, así como la medición realizada a las 72 del °Brix y pH después de la fermentación.

Producción de biomasa

Como resultado del proceso fermentativo, se generó biomasa microbiana producto del crecimiento del microorganismo en el medio Mandels suplementado. La cuantificación de esta biomasa permite evaluar indirectamente la eficiencia del proceso y la capacidad de adaptación del cultivo. En sistemas fermentativos aerobios, el incremento de biomasa es un indicador de una adecuada disponibilidad de nutrientes y oxígeno, factores clave en la producción de metabolitos secundarios como enzimas (Sun et al., 2023; Winkelhorst et al., 2023)

El total de biomasa producida durante la fermentación fue de aproximadamente 20 g, en peso húmedo, mientras que se obtuvieron aproximadamente 720 mL de extracto enzimático de celulasas recuperada tras centrifugación. Este valor refleja una adecuada adaptación y proliferación del microorganismo en el medio Mandels suplementado.

Figura 2. Recuperación del bioproducto



En la **Figura 2** se puede observar el pellet celular obtenido, el cual corresponde a la biomasa separada del sobrenadante durante la etapa de recuperación del bioproducto.

3.2 Caracterización microbiológica y fisicoquímica del producto final

Una vez finalizado el proceso fermentativo y recuperado el sobrenadante como bioproducto, se procedió a su caracterización con el fin de evaluar sus propiedades fisicoquímicas y microbiológicas. Esta etapa es fundamental para determinar la calidad del extracto enzimático obtenido y verificar la ausencia de contaminación.

Desde el punto de vista fisicoquímico, el bioproducto presentó una coloración amarillo-anaranjada y una apariencia ligeramente turbia (como se observa en la **Figura 3**) características asociadas tanto a los componentes del medio como a los productos derivados de la hidrólisis del sustrato y la reacción del método DNS.

Figura 3. Bioproducto luego de la reacción al método DNS



En la Figura 3 se pueden observar las características físicas como color amarillo-anaranjado y brillo medio, por la ligera turbidez del extracto enzimático de celulasas, después de la reacción al método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

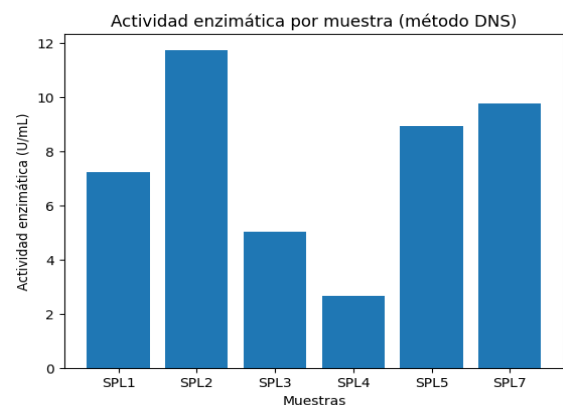
Con el fin de evaluar la producción enzimática, se compararon muestras correspondientes al tiempo inicial (Hora 0) y al tiempo final (72 horas). Las determinaciones se realizaron por triplicado, garantizando la confiabilidad de los resultados. La actividad enzimática fue determinada mediante el método DNS, el cual permitió cuantificar la liberación de azúcares reductores como resultado de la hidrólisis de la carboximetilcelulosa.

Los valores de actividad enzimática reportados en la **Tabla 2** corresponden a las muestras analizadas por triplicado descritas en la metodología.

Tabla 2 Actividad enzimática del extracto

Tiempo	Muestra	Actividad enzimática (U/mL)
Hora 0	SPL1	7.237
Hora 0	SPL2	11.734
Hora 0	SPL3	5.021
Hora 72	SPL4	2.654
Hora 72	SPL5	8.938
Hora 72	SPL6	No válido
Control	SPL7	9.769

Figura 4. Comparación de la actividad enzimática entre Hora 0 y 72 horas.



"Nota: Los resultados de la muestra SPL6 no se reportan "no válido" debido a que las lecturas de absorbancia se situaron por debajo del límite de detección, indicando una actividad enzimática nula o insignificante en ese punto."

En la **Figura 4** se observa la diferencia en la actividad enzimática entre las muestras correspondientes al inicio del proceso y aquellas obtenidas tras 72 horas de fermentación. Aunque se detectaron valores en el tiempo inicial, la actividad enzimática asociada al proceso fermentativo se evidencia en las muestras finales, confirmando la producción de enzimas celulolíticas durante el bioproceso. Esto quiere decir, que se registraron valores relativamente altos en las muestras correspondientes a la Hora 0 y que estos no representan producción enzimática del proceso, sino que pueden estar relacionados con diferentes causas como; la presencia de enzimas en el inóculo, interferencias del medio Mandels y reacciones inespecíficas del método DNS. Por lo tanto, la actividad enzimática real del proceso fermentativo se evalúa a las 72 horas, donde se obtuvo un valor máximo de **8.938 U/mL**, evidenciando una producción significativa de enzimas celulolíticas bajo las condiciones evaluadas.

La determinación de azúcares reductores se realizó mediante el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), a partir de la medición de la absorbancia de la muestra (0.540) y su comparación con un patrón de glucosa de 0.5 g/L (absorbancia 0.301), considerando un factor de dilución de 10. Este valor de absorbancia se encuentra dentro del rango de linealidad de la curva patrón (0.08 - 0.58 g/L), lo que valida la precisión de la interpolación realizada.

La concentración de azúcares reductores se estimó mediante la siguiente expresión:

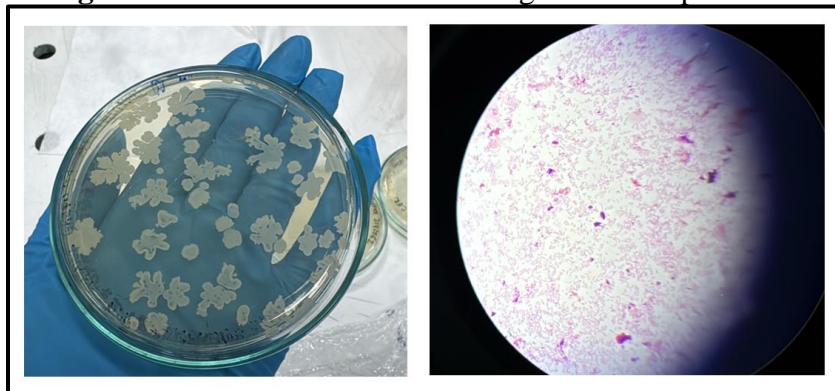
$$C = \left(\frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs patrón}} \times \text{Conc. patrón} \right) \times \text{Factor de dilución}$$

$$C = \left(\frac{0.540}{0.301} \times 0.5 \right) \times 10 = 8.97 \text{ mg/mL}$$

Este valor corresponde a la concentración de azúcares reductores liberados como resultado de la actividad enzimática. Es importante destacar que este valor confirma la hidrólisis de la carboximetilcelulosa y respalda la actividad enzimática observada.

De igual forma con la finalidad de verificar las características microbiológicas del producto, se confirmó la pureza de este por tinción de Gram y observación al microscopio, así como la ausencia de contaminantes indicando que el cultivo era puro y apto para el proceso, además de que la actividad enzimática observada corresponde al microorganismo inoculado.

Figura 5. Características microbiológicas del bioproducto.



En la **Figura 5** se pueden observar estas características microbiológicas del extracto enzimático obtenido, como la morfología colonial compatible con microorganismos celulolíticos (formas irregulares, bordes filamentosos, color blanco opaco) de la placa y la presencia de bacilos esporulados Gram + a través de la tinción de Gram visualizada al microscopio con objetivo 100x, así como la ausencia de contaminantes externos en el inóculo. De igual forma en la **Tabla 3** se contemplan los resultados de las características fisicoquímicas y microbiológicas del producto final

Tabla 3 Resultados de control fisicoquímico y microbiológico del extracto enzimático

Ausencia/Presencia microbiana	pH	Actividad enzimática máx. a 37 °C (Hora 0)	Actividad enzimática máx. a 50 °C (Hora 72)
Ausencia de contaminantes	6.73	11.734 U/mL	8.938 U/mL

3.3 Discusión de resultados

Los resultados obtenidos evidencian que el proceso de fermentación celulolítica se desarrolló de manera eficiente bajo las condiciones establecidas. El incremento en la concentración microbiana desde 1.2×10^9 hasta 2.1×10^{10} UFC/mL indica un crecimiento adecuado del microorganismo, favorecido por condiciones óptimas de temperatura (37 °C) y agitación constante (150 rpm), las cuales permiten una adecuada transferencia de oxígeno y homogenización del medio. Este comportamiento es consistente con lo reportado en fermentaciones sumergidas de *Bacillus*, donde la optimización de parámetros físicos como temperatura y velocidad de agitación (en torno a 37–40 °C y 150 rpm) incrementa de forma significativa tanto el crecimiento como la actividad celulolítica (Islam et al., 2019; Malik & Javed, 2024; Wang et al., 2024).

Aunque se detectaron valores de actividad enzimática en la Hora 0, estos no son representativos del proceso fermentativo, ya que pueden estar asociados al inóculo o a interferencias del método DNS. Este tipo de comportamiento ha sido reportado en sistemas donde el medio o componentes celulares generan respuestas colorimétricas inespecíficas, lo que puede llevar a sobreestimar la liberación de azúcares reductores al inicio del ensayo (Deshavath et al., 2020; Sobral Teixeira et al., 2012).

Los valores mostrados en la **tabla 2** confirman que el microorganismo fue capaz de producir enzimas celulolíticas de manera efectiva bajo las condiciones establecidas. La variabilidad observada entre muestras puede atribuirse a diferencias en la concentración del extracto enzimático, diluciones realizadas o variaciones experimentales durante el análisis. Así mismo, la actividad enzimática real del proceso se evidenció a las 72 horas, alcanzando valores cercanos a 8.938 U/mL, lo cual confirma la capacidad del microorganismo para producir enzimas celulolíticas en presencia de carboximetilcelulosa como sustrato inductor. En sistemas con *Bacillus*, la carboximetilcelulosa (CMC/CMC-Na) se utiliza de forma rutinaria como fuente de carbono e inductor específico de celulasas, permitiendo alcanzar actividades enzimáticas optimizadas tras el ajuste de las condiciones de cultivo (Dobrzyński et al., 2022; Wang et al., 2024). Además, se ha demostrado que cambios en la composición del medio y en la disponibilidad de CMC modulan la

expresión de un conjunto de celulasas y otras enzimas extracelulares, reforzando su papel como inductor en bacterias del género *Bacillus* (Bouzaïene et al., 2023; Wu et al., 2021).

El valor de 8.97 mg/mL de azúcares reductores evidencia la hidrólisis efectiva del sustrato celulósico, lo cual respalda la actividad enzimática observada. Durante la degradación de biomasa lignocelulósica, la liberación de azúcares reductores (glucosa, celobiosa y oligosacáridos) se utiliza como indicador directo del grado de hidrólisis de celulosa y hemicelulosa, y se correlaciona con la acción conjunta de enzimas celulolíticas (endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas) (Namboonlue et al., 2025; Wu et al., 2021). De este modo, la acumulación de azúcares reductores observada es coherente con un sistema celulolítico activo y funcional.

No obstante, el comportamiento constante de los °Brix (en 1.5°) durante el proceso sugiere posibles interferencias en la medición, atribuibles a la presencia de compuestos derivados de la cáscara de naranja, tales como pectinas, aceites esenciales y otros sólidos solubles no fermentables. En matrices alimentarias complejas, el índice de refracción se ve afectado por proteínas, grasas, polisacáridos y otros solutos, lo que puede distorsionar la relación directa entre °Brix y azúcares fermentables y reducir la precisión de los métodos refractométricos, especialmente en sistemas turbios con alta carga de sólidos y biomasa (Dongare et al., 2015; Jaywant et al., 2022).

Por otro lado, el ligero aumento del pH hasta 6.73 al final del proceso puede estar relacionado con cambios metabólicos del microorganismo, particularmente con la utilización de fuentes nitrogenadas y la liberación de compuestos alcalinos como el amoníaco o con rutas metabólicas que consumen protones. En fermentaciones de residuos orgánicos se ha observado que la transformación del nitrógeno orgánico a amonio y ciertas vías metabólicas (por ejemplo, vías de degradación de aminoácidos) contribuyen al incremento del pH del medio a medida que avanza el proceso (Zhao et al., 2024; Zhou et al., 2021). Este tipo de desplazamiento hacia valores ligeramente más alcalinos tras el agotamiento parcial de las fuentes de carbono es consistente con el comportamiento descrito para diversos sistemas bacterianos.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que el proceso fue exitoso, logrando tanto el crecimiento microbiano como la producción de enzimas celulolíticas. Además, se evidencia la efectividad del uso de carboximetilcelulosa y cáscara de naranja como sustratos en sistemas fermentativos, en línea con el creciente interés por emplear residuos lignocelulósicos agroindustriales como materia prima para la producción de celulasas y otros bioproductos, contribuyendo a la valorización de estos subproductos en el contexto de biotecnología y bioenergía sostenible (Bouzaïene et al., 2023; Malik & Javed, 2024; Mejía Florian et al., 2025; Sánchez-Castelblanco & Heredia-Martín, 2024; Wu et al., 2021).

5. Conclusión

Después de 3 días (72 horas) de fermentación de un caldo Mandels suplementado con carboximetilcelulosa (CMC) al 1% como fuente de celulosa y cáscara de naranja, utilizando un inóculo bacteriano de aproximadamente 1.2×10^9 UFC/mL aislado a partir de este sustrato, se obtuvieron aproximadamente 720 mL de un extracto enzimático de celulasas con una actividad de 8.938 U/mL al final del proceso. El crecimiento microbiano alcanzó 2.1×10^{10} UFC/mL, evidenciando un desarrollo eficiente bajo condiciones de 37 °C y 150 rpm.

La producción de azúcares reductores (8.97 mg/mL) confirmó la hidrólisis efectiva del sustrato celulósico. Aunque se registró una actividad enzimática máxima de 11.734 U/mL en mediciones puntuales, el valor obtenido a las 72 horas representa el comportamiento final del sistema fermentativo.

En conclusión, los resultados demuestran que el proceso fue eficiente para la producción de enzimas celulolíticas, destacando el potencial del uso de residuos agroindustriales como sustratos en aplicaciones biotecnológicas.

Referencias Bibliográfica

1. Bhardwaj, N., Kumar, B., Agrawal, K., & Verma, P. (2021). Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00447-6>.
2. Bouzaïene, T., Ziadi, M., Enneifer, M., Sellami, A., Aydi, A., Cherif, A., & Hamdi, M. (2023). Cellulolytic Bacillus Strain: Production Optimization Using Wheat Bran under Solid-State Fermentation and Investigation of Its Probiotic Potential. *Sustainability*, 15(10), 8394. <https://doi.org/10.3390/su15108394>.
3. de Souza, T. S. P., & Kawaguti, H. Y. (2021). Cellulases, Hemicellulases, and Pectinases: Applications in the Food and Beverage Industry. *Food and Bioprocess Technology*, 14(8), 1446–1477. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02678-z>.
4. Deshavath, N. N., Mukherjee, G., Goud, V. V., Veeranki, V. D., & Sastri, C. V. (2020). Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.045>.
5. Dobrzyński, J., Wróbel, B., & Górska, E. B. (2022). Cellulolytic Properties of a Potentially Lignocellulose-Degrading Bacillus sp. 8E1A Strain Isolated from Bulk Soil. *Agronomy*, 12(3), 665. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030665>.
6. Dongare, M. L., Buchade, P. B., & Shaligram, A. D. (2015). Refractive index based optical Brix measurement technique with equilateral angle prism for sugar and Allied Industries. *Optik*, 126(20), 2383–2385. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2015.05.137>.
7. Ejaz, U., Sohail, M., & Ghanemi, A. (2021). Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. *Biomimetics*, 6(3), 44. <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>.
8. GHAZANFAR, M., IRFAN, M., NADEEM, M., SHAKIR, H. A., KHAN, M., ALI, S., SAEED, S., & MEHMOOD, T. (2021). ISOLATION OF CELLULOLYTIC BACTERIA FROM SOIL AND VALORIZATION OF DIFFERENT LIGNOCELLULOSIC WASTES FOR CELLULASE PRODUCTION BY SUBMERGED FERMENTATION. *Cellulose Chemistry and Technology*, 55(7-8), 821–828. <https://doi.org/10.35812/cellulosechemtechnol.2021.55.69>.
9. Hussain, M. H., Ashraf, K., Abdullah Alqudaimi, R. E., Martuscelli, M., Leu, S.-Y., Rehman, S., Aslam, M. S., Li, Z., Khaliq, A., Zhuang, Y., Guo, M., & Mohsin, A. (2025). From Waste to Wealth: Unlocking the Potential of Cellulase Characteristics for Food

Processing Waste Management. *Foods*, 14(21), 3639.
<https://doi.org/10.3390/foods14213639>.

10. Ilić, N., Milić, M., Beluhan, S., & Dimitrijević-Branković, S. (2023). Cellulases: From Lignocellulosic Biomass to Improved Production. *Energies*, 16(8), 3598.
<https://doi.org/10.3390/en16083598>.
11. Islam, M., Sarkar, P. K., Mohiuddin, A. K. M., & Suzauddula, Md. (2019). Optimization of fermentation condition for cellulase enzyme production from *Bacillus* sp. *Malaysian Journal of Halal Research*, 2(2), 19–24. <https://doi.org/10.2478/mjhr-2019-0009>.
12. Jayasekara, S., & Ratnayake, R. (2019). Microbial Cellulases: An Overview and Applications. In *www.intechopen.com*. IntechOpen.
<https://www.intechopen.com/chapters/66517>.
13. Jaywant, S. A., Singh, H., & Arif, K. M. (2022). Sensors and instruments for brix measurement: A review. *Sensors*, 22(6), 2290. <https://doi.org/10.3390/s22062290>.
14. Malik, W. A., & Javed, S. (2024). Enhancement of cellulase production by cellulolytic bacteria SB125 in submerged fermentation medium and biochemical characterization of the enzyme. *International Journal of Biological Macromolecules*, 263, 130415.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130415>.
15. Malik, W. A., Khan, H. M., & Javed, S. (2021). Bioprocess Optimization for Enhanced Production of Bacterial Cellulase and Hydrolysis of Sugarcane Bagasse. *BioEnergy Research*, 15(2), 1116–1129. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10259-3>.
16. Mejía Florian, E. D., Delgado Monroy, N. D., Arismendy Pabón, A. M., Muñoz Peñaloza, Y. A., & Reyes Galvis, M. L. (2025). Obtención de enzimas celulasas a partir de residuos agroindustriales por fermentación sumergida. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 27(1), 26–36. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.117573>.
17. Namboonlue, S., Ngowsakul, K., Nakarat, K., Kongsinkaew, C., Subjaleearndee, N., Uttayopas, P., Charoenrat, T., & Laemthong, T. (2025). Predictive reducing sugar release from lignocellulosic biomass using sequential acid pretreatment and enzymatic hydrolysis by harnessing a machine learning approach. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 27, 4246–4256. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2025.09.027>.
18. Pham, V. H. T., Kim, J., Shim, J., Chang, S., & Chung, W. (2022). Coconut Mesocarp-Based Lignocellulosic Waste as a Substrate for Cellulase Production from High Promising Multienzyme-Producing *Bacillus amyloliquefaciens* FW2 without Pretreatments. *Microorganisms*, 10(2), 327. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020327>.
19. Rajesh, R., & Gummadi, S. N. (2022). Production of multienzymes, bioethanol, and acetic acid by novel *Bacillus* sp. PM06 from various lignocellulosic biomass. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02418-z>.
20. Sánchez-Castelblanco, E. M., & Heredia-Martín, J. P. (2024). Obtención de celulasas bacterianas usando residuos orgánicos generados en plazas de mercado. *Revista U D c a Actualidad & Divulgación Científica*, 27(1).
<https://doi.org/10.31910/rudca.v27.n1.2024.2264>.

21. Sobral Teixeira, R. S., da Silva, A. S., Ferreira-Leitão, V. S., & da Silva Bon, E. P. (2012). Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements. *Carbohydrate Research*, 363, 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.09.024>.
22. Sun, Y., Kokko, M., & Vassilev, I. (2023). Anode-assisted electro-fermentation with *Bacillus subtilis* under oxygen-limited conditions. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02253-4>.
23. Wang, J., Bao, F., Wei, H., & Zhang, Y. (2024). Screening of cellulose-degrading bacteria and optimization of cellulase production from *Bacillus cereus* A49 through response surface methodology. *Scientific Reports*, 14(1), 7755. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58540-7>.
24. Winkelhorst, M., Cabau-Peinado, O., Straathof, A. J. J., & Jourdin, L. (2023). Biomass-specific rates as key performance indicators: A nitrogen balancing method for biofilm-based electrochemical conversion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1096086>.
25. Wu, Y., Guo, H., Rahman, M. S., Chen, X., Zhang, J., Liu, Y., & Qin, W. (2021). Biological pretreatment of corn stover for enhancing enzymatic hydrolysis using *Bacillus* sp. P3. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00445-8>.
26. Zhao, C., Yang, L., Li, H., & Deng, Z. (2024). Nitrogen Metabolism during Anaerobic Fermentation of Actual Food Waste under Different pH Conditions. *Fermentation*, 10(3), 129. <https://doi.org/10.3390/fermentation10030129>.
27. Zhou, S., Geng, B., Li, M., Li, Z., Liu, X., & Guo, H. (2021). Comprehensive analysis of environmental factors mediated microbial community succession in nitrogen conversion and utilization of ex situ fermentation system. *Science of the Total Environment*, 769, 145219. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145219>.