

HIDRÓLISIS DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS CON EL CONSORCIO BACTERIANO ARTIFICIAL CF2-HCM2

Mata Salas Ana Cecilia (1), González Castañeda Jaquelina (2)

1 [Ingeniería Ambiental, División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [ceci_msalas@outlook.com]

2 [Departamento de Ciencias Ambientales, División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [jaquegc1@hotmail.com]

Resumen

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante en la Tierra. La hidrólisis enzimática se lleva a cabo por microorganismos que producen endo-1,4- β -glucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas. El objetivo del presente trabajo fue cuantificar la degradación de sustratos lignocelulósicos, por el consorcio bacteriano artificial CF2-HCM2, en pajas de trigo, sorgo y cebada. Las pajas fueron pretratadas térmicamente a 121°C, durante 15 min, se inocularon en medio mínimo, con sustratos de CMC, PF o pajas pretratadas. Se incubaron a 34.0±0.1°C, durante 72 horas, a pH de 7.0, con regulador de fosfatos. La liberación de azúcares reductores se evaluó con DNS. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados muestran una Absorbancia tres veces mayor en CMC que en PF, a las 56 horas de incubación, 0.747 y 0.230, respectivamente. Los azúcares reductores en CMC fueron 4.7 veces más que en PF, a las 52 horas de incubación, 0.42 y 0.09 g/L, respectivamente. Las pajas de trigo y cebada mostraron mayor liberación de azúcares reductores a las 72 horas, 0.78 y 0.68 g/L, respectivamente. El consorcio bacteriano artificial CF2-HCM2, muestra degradación de residuos lignocelulósicos de pajas pretratadas de trigo, sorgo y cebada, con un potencial para la producción de bioenergéticos.

Abstract

Cellulose is the most abundant organic compound on Earth. Enzymatic hydrolysis is carried out by microorganisms producing endo 1, 4- B glucanases, celobiohidrolasas and B glucosidasas. The objective of the present study was to quantify the degradation of lignocelulosic substrates, by the artificial bacterial consortium CF2-HCM2 in wheat, sorghum and barley straw. Straws were thermally pretreated at 121 °C for 15 min. Different carbon sources such as CMC, PF or pretreated straws were added to a Minimal Medium, furthermore, they were inoculated with CF2-HCM2. They were incubated at 34.0±0.1°C during 72 hours, with adjustment of pH at 7.0, regulator of phosphates. Release of reducing sugars were evaluated with DNS. The experiments were carried out in triplicate. The results showed that absorbance was one three times higher in CMC than in PF after 56 hours of incubation values were 0.747 and 0.230, respectively. The realease of reducing sugar in CMC were 4.7 higher than PF after 52 hours of incubation, where values were 0.42 and 0.09 g/L, respectively. The straws wheat and barley showed an increase in release of reducing sugars after 72 hours with Values of 72, 0.68 and 0.78 g/l, respectively. CF2-HCM2, hdirolize pretreated straws of wheat, sorghum and barley lignocellulosic waste, within a potential for the production of bioenergy.

Palabras Clave

Carboximetilcelulosa, Paja de trigo; Paja de sorgo; Paja de cebada; Azúcares reductores.

INTRODUCCIÓN

La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas, está compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina [1]. La lignina es el componente más abundante de la biomasa lignocelulósica, seguida de la celulosa y la hemicelulosa [2], es el producto de la fotosíntesis y la fuente de carbono renovable más prometedora, para solucionar los problemas actuales de energía [3].

La biomasa lignocelulósica involucra la formación de cadenas largas de polisacáridos, para su degradación se necesita la liberación de las cadenas de polímeros y la subsecuente hidrólisis, en azúcares simples de cinco a seis carbonos [4]. La hidrólisis enzimática de la celulosa implica la acción secuencial de un grupo de enzimas, conocidas como celulasas, que pertenecen a la superfamilia de las glicosil hidrolasas, llamadas así, porque catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico entre dos o más hidratos de carbono [5]. Los residuos lignocelulósicos son materias primas que pueden ser utilizados en procesos consolidados con microorganismos, como una alternativa de aprovechamiento de residuos vegetales con alto potencial [6].

La producción de biocombustibles, a partir de la celulosa es un proceso barato y biológicamente favorable [7].

Justificación

Actualmente, el Laboratorio de Biotecnología Ambiental, de la División de Ciencias de la Vida, cuenta con una colección de consorcios bacterianos con actividad celulolítica, con los cuales se ha evaluado la degradación de la celulosa, en pajas de trigo, sorgo y cebada, pretratadas térmicamente y con métodos alcalino oxidativos. Sin embargo se requiere estudiar otras condiciones de pretratamiento para incrementar la degradación de los sustratos antes mencionados, con el consorcio bacteriano artificial CF2-HCM2.

Hipótesis

El consorcio bacteriano artificial CF2-HCM2, tiene la capacidad de degradar los residuos lignocelulósicos pretratados térmicamente.

Objetivo:

El objetivo de esta investigación fue cuantificar la degradación de sustratos lignocelulósicos por el consorcio bacteriano artificial CF2- HCM2, en diferentes tipos de pajas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizó el consorcio bacteriano artificial CF2-HCM2, incubado en un Medio Mínimo con sustratos de Carboxi Metil Celulosa (CMC), Papel Filtro (PF), paja de trigo, sorgo o cebada.

Sustratos utilizados

CMC (SIGMA, CAS 9004-32-4), PF (Whatman 3MM Chr).

Las pajas de trigo, sorgo y cebada fueron recolectadas de cosechas agrícolas del estado de Guanajuato.

Pretratamientos

Molienda

La reducción del tamaño del PF y pajas, se hizo mediante molienda y tamizado a una malla de 2 mm.

Térmico

Las pajas de trigo, sorgo y cebada fueron sometidas a un calentamiento húmedo a 121°C, durante 15 minutos [8].

Análisis cualitativo de la producción enzimática

Se realizó una resiembra del consorcio bacteriano artificial CF2-HCM2 en el Medio Mínimo de CMC al 1 % (p/v), a pH 7.0, mediante la técnica de siembra en superficie, al centro de la caja Petri. Se

incubó a una temperatura de $30.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ por 72 horas. Finalizado el tiempo de incubación, el cultivo se inundó con una solución acuosa de Rojo Congo al 1% (p/v), durante 15 min. El exceso de colorante se eliminó con NaCl 1M [9]. La formación de una zona clara alrededor de la UFC, indicó la hidrólisis de la CMC del medio, la presencia del halo, se reporta como prueba positiva [10].

Condiciones de fermentación con diferentes fuentes de carbono

Para la cinética de crecimiento se utilizó Medio Mínimo con los sustratos de CMC, PF o pajas pretratadas, a una concentración del 2%, a pH 7.0, con regulador de fosfatos. Se inocularon al 10 % con el consorcio bacteriano CF2-HCM2, ajustado a una Absorbancia (Abs) de 0.2 a 500 nm. Se incubaron durante 72 horas a una temperatura de $34.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Se hicieron muestreos a las 0, 4, 8, 24, 28, 32, 48, 52, 56 y 72 horas de incubación. Se leyó la Absorbancia en un espectrofotómetro marca Eppendorf Bio Spectrometer. Para PF a 475 nm, CMC a 500 nm y las pajas pretratadas a 540 nm.

Efecto de diferentes fuentes de carbono en la liberación de azúcares reductores.

Para evaluar el efecto del consorcio bacteriano artificial sobre los sustratos, se realizaron muestreos durante las 72 horas de incubación, para determinar la liberación de azúcares reductores, fueron cuantificados con el ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS), utilizando glucosa como estándar [11].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la IMAGEN 1, se muestra el crecimiento del consorcio bacteriano CF2-HCM2, en las placas de agar CMC, se observa la zona más clara del colorante, en forma de halo, de 25 mm alrededor de la UFC, indicando su hidrólisis [12].

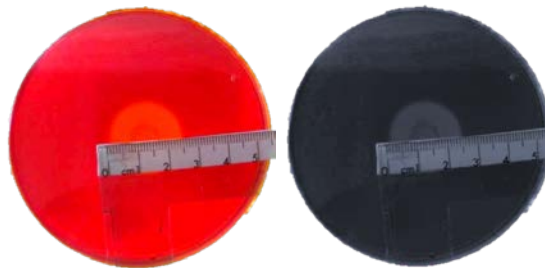


IMAGEN 1: Crecimiento del consorcio bacteriano artificial CF2-HCM2 en Medio Mínimo CMC, indicando el halo de hidrólisis.

En las IMAGENES 2 Y 3, se muestran las cinéticas de crecimiento de CF2-HCM2, con los sustratos de CMC y PF, respectivamente. Como puede observarse el consorcio muestra la capacidad de utilizar ambos sustratos como fuente de carbono. El mayor crecimiento en CMC, se alcanza a las 56 horas de incubación con una Abs de 0.748. El menor crecimiento se observa en PF, con valores de Abs de 0.230, para el mismo periodo de incubación. Otros investigadores reportan diferencias en el crecimiento de la bacteria *Paenibacillus glucanolyticus*, cuando utilizan como sustratos maderas con diferentes durezas [13]. En otras investigaciones se reporta *Trabulsiella* sp, con un crecimiento lento entre los cuatro y cinco días, a partir del quinto día se observa un crecimiento exponencial [14]. En ésta investigación CMC solo presenta la fase exponencial, indicando que CF2-HCM2, podría tener la capacidad de degradar sustratos más complejos como son las pajas pretratadas de trigo, sorgo y cebada.

En la IMAGEN 4, se observa el efecto de CMC y PF, en la liberación de azúcares reductores [15]. Un factor importante a considerar en la producción de enzimas, es la fuente de carbono utilizada durante la fermentación. En ésta investigación la mayor liberación de azúcares reductores se observó en el CMC, a las 52 horas de incubación, con 0.420 g/L, por el contrario en PF, se muestra una concentración de 0.090 g/L, para el mismo periodo, es decir 4.7 veces más con CMC que con PF. Esto nos permite asumir que el CMC, tiene una estructura menos compleja que PF. Otros investigadores reportan el uso de varios azúcares y fuentes de carbono para la producción de enzimas lo que permite una mayor asimilación por el microorganismo [16].

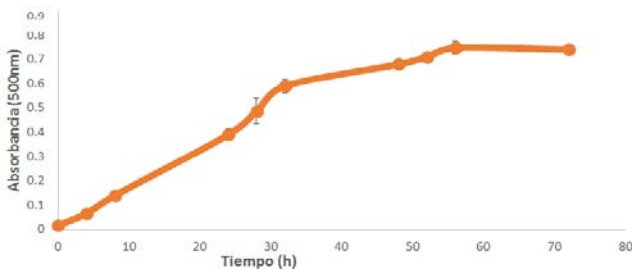


IMAGEN 2: Efecto del CMC, en el crecimiento del consorcio bacteriano artificial CF2- HCM2, incubado a 34+0.1°C, pH 7.0, durante 72 horas.

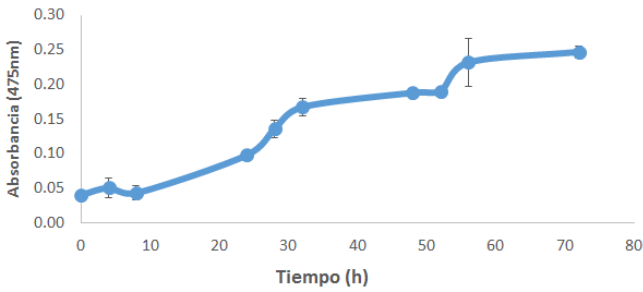


IMAGEN 3: Efecto del PF, en el crecimiento del consorcio bacteriano artificial CF2- HCM2, incubado a 34+0.1°C, pH 7.0, durante 72 horas.

En la IMAGEN 5, se muestra la liberación de los azúcares reductores en las pajas pretratadas de trigo y cebada, los resultados muestran mayor producción de azúcares reductores para trigo y cebada a las 72 horas de incubación, 0.78 g/L y 0.68 g/L, respectivamente, en tanto que para sorgo fue a las 56 horas, con 0.59g/L, valdría considerar una disminución del rendimiento del 7%, en trigo pretratado, al parar la fermentación a las 56 horas de incubación (0.73 g/L) [17].

Se reporta que las pajas de trigo son un medio rico en nutrientes como proteínas, carbohidratos, minerales, entre otros, lo que favorece el crecimiento de las bacterias y la producción de enzimas [18, 19].

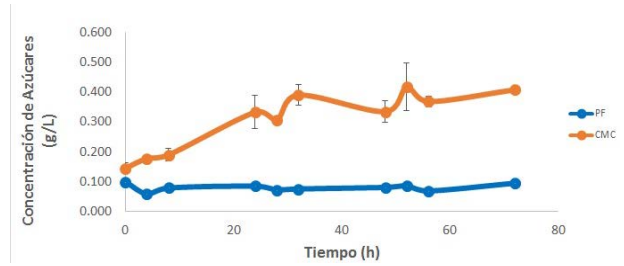


IMAGEN 4: Efecto de CMC y PF, en la liberación de azúcares reductores por el consorcio bacteriano artificial CF2-HCM2, incubado a 34+0.1°C, pH 7.0, durante 72 horas.

Otros investigadores reportan rendimientos para *Trichoderma reesei*, de 56.0% en celulosa pretratada, en comparación con un rendimiento del 23.6% cuando no hubo pretratamiento. También se reporta que pretratamientos hidrotérmicos mejoran la solubilidad de la hemicelulosa y lignina, lo que mejora el proceso de hidólisis [6]. Otros investigadores reportan que la bacteria *Trabulsilla guamensis*, aislada del intestino de las termitas degrada compuestos lignocelulósicos, con eficiencias del 60% a las 28 días [3].

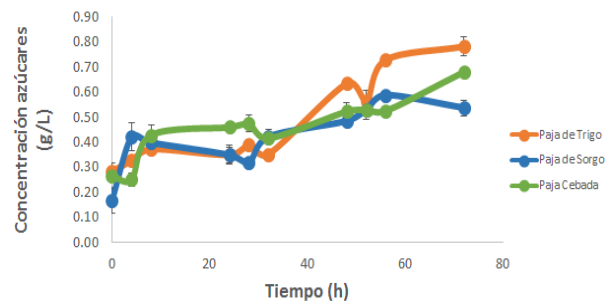


IMAGEN 5: Efecto de pajas de trigo, sorgo y cebada, en la producción de azúcares reductores, incubado a 34+0.1°C, pH 7.0, durante 72 horas.

CONCLUSIONES

Con respecto a la prueba cualitativa, el consorcio bacteriano artificial CF2- HCM2, utiliza CMC y PF como sustratos con actividad hidrolítica.

El consorcio bacteriano artificial CF2-HCM2, muestra la liberación de azúcares reductores a partir de residuos lignocelulósicos de pajas pretratadas de trigo, sorgo y cebada, con potencial para la producción de bioenergéticos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (DAIP), UG. División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, por darme la oportunidad de realizar el Verano de Investigación. Asimismo, agradezco a todas las personas que me acompañaron y apoyaron en el trayecto especialmente a mis compañeros de laboratorio, a la Dra. Jaquelina González Castañeda, Jesús Martínez Hernández y a mis padres que me dieron su apoyo incondicional.

REFERENCIAS

- [1] Mathews S.L., Amy M. Grunden A. M. & Pawlak. J. Degradation of lignocellulose and lignin by *Paenibacillus glucanolyticus*. (2016). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 110, 79-86.
- [2] Ruiz-Duenas, F.J. & Martínez, A.T. (2009). Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microb. Biotechnol.* 2, 164-177.
- [3] Suman, S.K., Dhawaria, M., Tripathi, D., Raturi, V., Adhikari D.K. & K. Kanaujia P.K. (2016). Investigation of lignin biodegradation by *Trabulsiella* sp. isolated from termite gut. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 112, 12-17
- [4] 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.
- [5] Barberis, C. L., Landa. M., Barberis, M. G., Gaj-Merlera, G., Dalcerro, A. M. & Magnoli, C. E. (2014). Hydrolytic enzymes production by *Aspergillus section Nigri* in presence of butylated hydroxyanisole and propyl paraben on peanut meal extract agar. *Rev Iberoam Micol*, 31 (2), 131–136.
- [6] Zhao, Y., Tan, H., Xu, Y. & Zou, L. (2016). Multi-level dissolution and hydrolysis of lignocellulosic waste with a semi-flow hydrothermal system. *Bioresource Technology*, 214, 496–503.
- [7] Sun, S., Sun, S., Cao, X. & Sun R. (2016). The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology*, 199, 49–58.
- [8] Viguera Carmona, S.E., Zafra Jiménez, G., García Rivero, M., Martínez Trujillo. M.A. & Pérez Vargas, J. (2013). Effect of various pretreatments on anaerobic biodegradability and quality microbiology of waste activated sludge. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12 (2), 293-301.
- [9] Arriffin, H., Abdullan, N., Umi, Kalson M., Shirai, Y. & Hassan, M. (2006). Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *International Journal of Engineering and Technology*, 3, (1), 47-53
- [10] Teather, R.M. & Wood, D.J. (1982). Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 43 (4), 777-780.
- [11] Miller, G. L (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- [12] Narasimha, G. A., Sridevi, V., Buddolla, C.M., Subhosh & Rajasekher, R.B (2006). Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *Afr. J. Biotechnol.*, 5, 472-476.
- [13] Mathews, S.L., Pawlak, J. & Grunden, A.M. (2014). Isolation of *Paenibacillus glucanolyticus* from pulp mill sources with the potential to deconstruct pulping waste. *Bioresour. Technol.* 164, 100-105.
- [14] Brown, M.E. & Chang, M.C.Y. (2014). Exploring bacterial lignin degradation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 19, 1-7.
- [15] Hari Krishna, S., Janarghan Reddy, T., Chowdary, G.V. (2001). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technol.* 77, 193-196.
- [16] Tollefson, J. (2008). "Energy: not your's father biofuels". *Nature*, 45, 880-883.
- [17] González-Rentería, S.M., Soto-Cruz N.O. , Rutiaga-Quiñone,s O.M., Medrano-Roldán, H. , Rutiaga-Quiñones, J.G. & López-HYDROLYSIS PROCESS OF FOUR STRAW BEAN VARIETIES
- [18] Saha, B.C., Loren, B.I., Michael, A.C. & Wu, Y.V. (2005). Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. *Biotechnology Progress* 21, 816-822
- [19] Silverstein, R.A., Ye, Ch., Ratna, R., Sharma-Shivappa, Boyette, D.M. & Osborne, J. (2007). A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology*, 98, 3000-3011.