

HIDRÓLISIS DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS CON LA BACTERIA CF2

Delgado Mendoza Claudia Itzel (1), González Castañeda Jaquelina (2)

¹ Licenciatura en Ingeniería Ambiental, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. | claudia_dmendoza@hotmail.com

² Departamento de Ciencias Ambientales, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato | jaquegc1@hotmail.com

Resumen

La celulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas, constituido por celulosa, lignina y hemicelulosa, se considera el biopolímero más abundante en la Tierra. Los pretratamientos físicos y térmicos, modifican la estructura de la lignina y hemicelulosa, lo que permite hidrolizar posteriormente a la celulosa. El objetivo del presente trabajo fue cuantificar la degradación de celulosa con la bacteria CF2, en diferentes tipos de pajas, mediante la liberación de azúcares reductores. A las pajas de trigo, sorgo y cebada, se les realizó un pretratamiento físico y térmico. Se inocularon en un medio mínimo, utilizando como fuentes de carbono, CMC, PF o pajas, los experimentos se realizaron por triplicado. Se incubaron a 37°C, durante 72 horas, a pH de 6.0, con regulador de fosfatos y agitación a 120 rpm. La producción enzimática para los diferentes sustratos utilizados, se realizó por el método de DNS. La mayor liberación de azúcares reductores por CF2 se observó en la paja de cebada a las 48 horas de incubación (0,720 g/L). La bacteria CF2 muestra potencial para la degradación de pajas pretratadas de cebada, seguida por sorgo y trigo, como un potencial para producción de biocombustibles a partir de residuos lignocelulósicos.

Abstract

Cellulose is the main component of the cell-wall of plants, contains of cellulose, lignin and hemicellulose, it is considered the most abundant biopolymer on Earth. Physical and thermal pre-treatments modify the structure of lignin and hemicellulose, which enables hydrolyze subsequently to cellulose. The objective of the present study was to quantify the degradation of cellulose with the bacterium CF2, in different types of straws, through the release of reducing sugars. Physical and thermal pre-treatment were applied to straw of wheat, sorghum and barley. Different carbon sources such as CMC, PF or pretreated straws were added to a Minimal Medium, furthermore, they were inoculated with CF2. They were incubated at 34 °C for 72 hours, at pH 6.0, regulator of phosphates and agitation at 120 rpm. Different substrates were used for enzyme production and were performed by DNS method. The highest release of reducing sugars was observed in barley straw after 48 hours of incubation, 0,720 g/L. The CF2 bacterium shows potential for degradation straws pre-treated of barley, followed by sorghum and wheat, such as for production of biofuels from lignocellulosic straws.

Palabras Clave

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

INTRODUCCIÓN

La celulosa es el principal componente de las paredes celulares de las plantas, es la fuente de carbono renovable más abundante en la naturaleza, está constituida por una larga cadena de polisacáridos [1,2]. Químicamente es un polímero de glucosas que se unen entre sí por enlaces β -1,4, disposición que la hace estable, además de poseer enlaces de hidrógeno que une sus moléculas entre sí, confiriéndole sus conocidas propiedades como material estructural de la pared celular [3]. De esta manera, se originan fibras compactas en las células vegetales, dándoles la rigidez necesaria.

Los principales granos producidos en el Estado de Guanajuato son, trigo, sorgo y cebada [4], durante la cosecha se generan grandes volúmenes de residuos agrícolas, consecuentemente una problemática medio ambiental. Ésta biomasa involucra contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina, disponibles para ser aprovechados. Para su degradación, se necesita la liberación de las cadenas de polímeros y la subsecuente hidrólisis, en azúcares simples de cinco a seis carbonos [5].

Una alternativa es la producción de biocombustibles, a partir de la celulosa, al considerar que es un proceso barato y biológicamente favorable [6].

La hidrólisis enzimática de la celulosa implica la acción secuencial de un grupo de enzimas, conocidas como celulasas, que pertenecen a la súper familia de las glicosil hidrolasas, llamadas así, porque catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico entre dos o más hidratos de carbono o entre estos y otras fracciones de la molécula [7].

Los azúcares simples son uno de los principales intermediarios en la conversión biológica y química de biomasa, pero la pared celular impide su acceso [8].

Justificación

Otros investigadores reportan el uso de bacterias y hongos para la degradación de residuos lignocelulósicos, sin embargo las bacterias tienen menos requerimientos para su crecimiento, lo que resulta ser más económico [2]. El Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la División de Ciencias de la Vida, cuenta con una colección de bacterias aisladas de suelos agrícolas de la región, por lo que se requiere conocer la capacidad para degradar diferentes fuentes de carbono.

Hipótesis

La bacteria CF2 degrada los residuos lignocelulósicos de pajas de trigo, sorgo y cebada.

Objetivo

El objetivo del trabajo fue cuantificar la degradación de celulosa con la bacteria CF2, en diferentes tipos de pajas, mediante la liberación de azúcares reductores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizó la bacteria CF2 inoculada en un Medio Mínimo con sustratos de Carboximetilcelulosa (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 utilizadas para el trabajo, fueron recolectadas de diferentes cosechas agrícolas del estado de Guanajuato.

Pretratamientos

Se le denomina pretratamiento al conjunto de acciones para mejorar el rendimiento en la obtención de azúcares fermentables desde la biomasa inicial.

Molienda

La reducción del tamaño de 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 [9].

Análisis cualitativo de producción de enzimas

Se realizó una resiembra de la bacteria CF2, en el Medio Mínimo de CMC al 1 % (p/v), a pH 6.0, por la técnica de siembra en superficie, al centro de la caja Petri. Se incubó a una temperatura de 30°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 [10]. La formación de una zona clara alrededor de la Unidad Formadora de Colonia (UFC), indicó la hidrólisis de CMC del medio, la presencia del halo, se reporta como prueba positiva [11].

Condiciones de fermentación con diferentes fuentes de carbono

Para la cinética de crecimiento se utilizó Medio Mínimo [10] con los sustratos de CMC, PF o pajas pretratadas, a una concentración del 2%, a pH 6.0, con regulador de fosfatos. Se inocularon al 10 % con la bacteria CF2, ajustado a una Absorbancia (Abs) de 0.2 a 500 nm. Se incubaron durante 72 horas a una temperatura de $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Se hicieron muestreos a las 0, 4, 8, 24, 28, 32, 48, 52, 56 y 72 horas. Se leyó la Absorbancia en un espectrofotómetro, Eppendorf Bio Spectrometer. El PF a 475 nm, CMC a 500 nm, pajas pretratadas a 540 nm [12].

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

El efecto de los sustratos de CMC, PF, pajas de trigo, sorgo y cebada, se evaluó mediante la liberación de azúcares reductores, durante la hidrólisis bacteriana, en los muestreos realizados durante las 72 horas de incubación, con el método del ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS), utilizando glucosa como estándar [13,14].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante los procesos mecánicos y térmicos, las estructuras de la lignina y hemicelulosa se desordenan, el arreglo se hace más asimétrico, lo que permite la hidrólisis enzimática de la celulosa [15,5].

En la IMAGEN 1, se muestra el crecimiento de la bacteria CF2, en las placas de agar CMC, se observa la zona más clara del colorante, en forma de halo, alrededor de la UFC, indicando su hidrólisis.

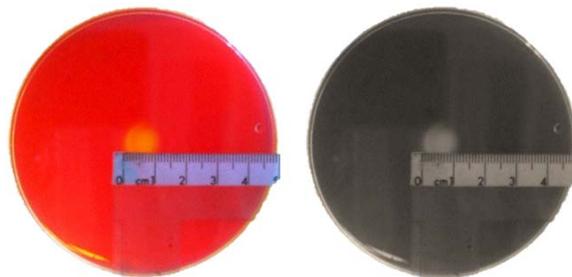


IMAGEN 1: Crecimiento de la bacteria CF2 en Medio Mínimo CMC, indicando el halo de hidrólisis.

En las IMAGENES 2 y 3, se muestra el efecto del crecimiento de la bacteria CF2, en CMC y PF, respectivamente. El mayor crecimiento se muestra en PF, alcanzando una Abs de 0.254 a las 28 horas de incubación. El menor crecimiento se observa en CMC, con valores de Abs de 0.072, para el mismo periodo de incubación, la bacteria muestra la capacidad de utilizar ambos sustratos como fuente de carbono, lo que puede indicar que podría tener la capacidad de degradar sustratos más complejos como son las pajas de Trigo, Sorgo y Cebada, pretratadas. Otros investigadores reportan diferencias en el crecimiento de la bacteria *Paenibacillus glucanolyticus*, cuando utilizan como sustratos maderas con diferentes durezas [16].

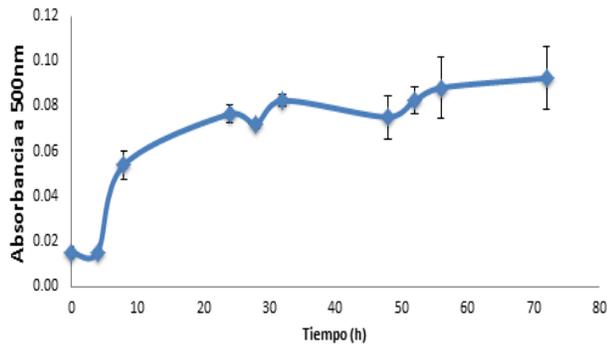


IMAGEN 2: Efecto del CMC en el crecimiento de la bacteria CF2, incubada a 37°C, a 120 rpm, durante 72 horas

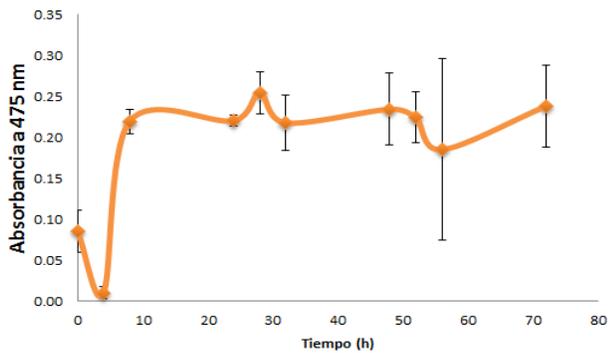


IMAGEN 3: Efecto de PF en el crecimiento de la bacteria CF2, incubada a 37°C, a 120 rpm, durante 72 horas

La producción de enzimas depende de la fuente de carbono utilizada durante la fermentación. En la IMAGEN 4, la bacteria CF2, muestra la mayor liberación de azúcares reductores en PF, a las 32 horas de incubación, con una concentración de 0.141 g/L, por el contrario en CMC, fue de 0.033 g/L, para el mismo periodo, lo que representa 4.27 más en PF que en CMC. Cabe resaltar que el PF tiene una estructura más compleja que el CMC, lo que indica el potencial de degradación de CF2. Otros investigadores reportan el uso de varios azúcares y fuentes de carbono para la liberación de azúcares. En la investigación con bagazo de caña de azúcar, con pretratamientos térmicos y químicos, se reporta la producción de glucosa con concentraciones de 27.3 g/L y 41.6 g/L, a las 24 y 48 horas de tiempo de reacción, respectivamente, con agitación entre 100 y 150 rpm. Como era de esperarse, los pretratamientos incrementan la liberación de azúcares reductores [8]. En películas

de lignina-celulosa, otros investigadores reportan, que la presencia de lignina mejora la liberación de glucosa a las 48 horas, 16.9mg/mL y 15.3mg/mL [17]. Los resultados obtenidos en esta investigación indican que la bacteria CF2, tiene potencial para la degradación de CMC y PF, mostrando más potencial con estructuras más complejas.

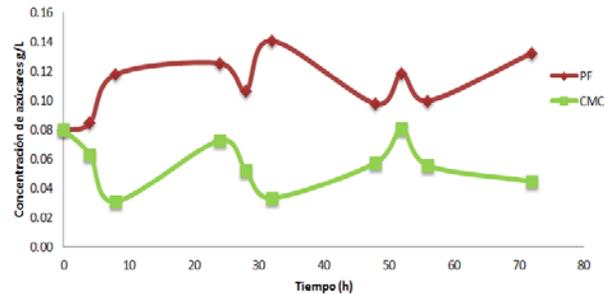


IMAGEN 4: Liberación de azúcares reductores de la bacteria CF2, teniendo como fuente de carbono CMC y PF, incubada a 37°C, a 120 rpm, durante 72 horas

En la IMAGEN 5, se muestra la liberación de azúcares reductores cuando se utilizan como sustrato pajas pretratadas de trigo, sorgo y cebada. Se observaron concentraciones entre 0.484 y 0.720 g/L. La mayor liberación se observó en la paja de cebada, seguida por sorgo y finalmente trigo (0.720, 0.567 y 0.484 g/L, respectivamente). Cabe resaltar que las liberaciones máximas fueron entre 28 y 48 horas, para la cebada, para el sorgo entre 24 y 28 horas, finalmente para el trigo entre 4 y 24 horas. Lo que indica que la estructura y complejidad de las pajas, influye en la hidrólisis. En investigaciones realizadas con pajas de frijol pretratadas, se reporta un rendimiento de 92±5%, a las 168 horas, en comparación a las no pretratadas, con un rendimiento de 76.37±14%, pudiendo disminuir costos al evitar los pretratamientos, a expensas del rendimiento [18]. Cabe destacar la importancia de evitar los pretratamientos químicos, para disminuir los costos de producción de etanol. Por lo que las pajas de trigo, sorgo y cebada presentan un potencial para ser utilizados en la producción de bioenergéticos.

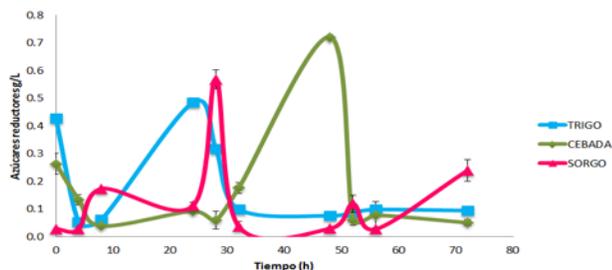


IMAGEN 5: Liberación de azúcares reductores de bacteria CF2 teniendo como fuente de carbono diferentes pajas (sorgo, trigo y cebada), incubada a 37°C, a 120 rpm, durante 72 horas

CONCLUSIONES

La bacteria CF2 muestra potencial para la degradación de pajas pretratadas de cebada, seguida por sorgo y trigo, como un potencial para producción de biocombustibles a partir de residuos lignocelulósicos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato por la oportunidad de realizar este verano de investigación. A la Dra. Jaquelina González Castañeda por darme la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos en el verano de investigación. A Jesús Martínez Hernández por su apoyo, atenciones y tiempo dedicado con el proyecto. A mi Familia por el constante apoyo, amor y compromiso para seguir con mis estudios.

REFERENCIAS

[1] Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T. & Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5 (2), 53–63.

[2] Karim, A., Nawaz, M.A., Aman, A. & UI Qader, S.A. (2015). Hyper production of cellulose degrading endo (1, 4) β -D-glucanase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB2. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(2), 160–165.

[3] Sánchez Riaño, A. M., Gutiérrez Morales, A. I., Muñoz Hernández, J. A. & Rivera Barrero, C. A. (2010). Bioethanol Production from agroindustrial lignocellulosic byproducts. *Revista Tumbaga*, 5, 61-91.

[4] Vélez Izquierdo, A., Espinosa García, J.A., Borja Bravo, M. & Reyes Muro, L. (2013). CIMYT 2013 Rastrojos manejo, uso y mercados en el centro y sur de México. Libro Técnico, (7), 138-185. Recuperado de file:///F:/BIBLIOGRAFIA/CIMYT%202013%20Rastrojos%20manejo,

%20uso%20y%20mercados%20en%20el%20centro%20y%20sur%20de%20México1.pdf

[5] 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.

[6] Sun, S., Sun, S., Cao, X. & Sun, S. (2016). The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology*. Pretreatment of Biomass, 199, 49–58.

[7] Barberis, C.L., Landa, M., Barberis, M. G., Gaj-Merlera, G., Dalcero, 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.

[8] Jiang, L., Zheng, A., Zhao, Z., He, F., Li, H. & Wu, N. (2016). The comparison of obtaining fermentable sugars from cellulose by enzymatic hydrolysis and fast pyrolysis. *Bioresource Technology*, 200, 8-13.

[9] 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.

[10] Ariffin, H., Abdullah, N., Umi Kalsom, M.S., Shirai, Y. & Hassa, M.A. (2006). Production and characterisation of cellulase by *Bacillus Pumilus* EB3. *International Journal of Engineering and Technology*, 3(1), 47-53.

ISSN 1823-1039 ©2006 FEIIC

[11] Teather, T.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.

[12] Kim, B.H. & Wimpenny, J. W. T. (1981). Growth and cellulolytic activity of *Cellulomonas flavigena*. *Research Press*, 27(12), 1260-1266.

[13] Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.

[14] Saquib, A. A. N. & Whitney, P.J. (2011). Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and disaccharide sugars. *Biomass and Bioenergy*, 35(11) 4748–4750.

[15] Gregg, D. & Sandler, J.N. (1996). A techno-economic assessment of the pretreatment and fractionation steps of a biomass-to-ethanol process. *Appl. Biochem. Biotech*, 57 (58), 711–727.

[16] Mathews, S.L., Grunden, A.M. & Pawlak, J. (2016). Degradation of lignocellulose and lignin by *Paenibacillus glucanolyticus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 110, 79–86.

[17] Zhang, L., Zhang, L., Zhou, T., Wu, Y. & Xu, F. (2016). The dual effects of lignin content on enzymatic hydrolysis using film composed of cellulose and lignin as a structure model. *Bioresource Technology*, 200, 761–769.

[18] González-Rentería, S.M., Soto-Cruz, N.O., Rutiaga-Quinones, O.M., Medrano-Roldán, H., Rutiaga-Quinones, J.G. & López-Miranda, J. (2011). Optimization of the enzymatic hydrolysis process of four straw bean varieties (Pinto villa, Pinto saltillo, Pinto mestizo and Flor de mayo). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10, (1) 7-28.