

OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS AISLADAS DE BACTERIAS METILOTRÓFICAS DE PIGMENTACIÓN ROSADA (PPFMS) DE SUELO DE JARDÍN PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Vargas Rivas, Alan Gabriel (1), De La Rosa Álvarez, M. Guadalupe (2), Molina G., Carlos E. (3),
García Castañeda, M. C. (4)

1 [Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica del Centro] | Dirección de correo electrónico: alangvr@hotmail.com

2 [Departamento de Ingenierías Química, Electrónica y Biomédica; División de Ciencias e Ingenierías, Campus León, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: delarosa@ugto.mx

3 [Departamento de Ingenierías Química, Electrónica y Biomédica; División de Ciencias e Ingenierías, Campus León, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: cmolina@fisica.ugto.mx

4 [Departamento de Ingenierías Química, Electrónica y Biomédica; División de Ciencias e Ingenierías, Campus León, Universidad de Guanajuato, CONACyT] | Dirección de correo electrónico: mcgarciaca@ugto.mx

Resumen

En los últimos años se ha insistido sobre la necesidad de generar biocombustibles, buscando reducir el impacto negativo de las emisiones de CO₂ al medio ambiente. Actualmente, las investigaciones se enfocan en encontrar enzimas y microorganismos eficientes para los procesos de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica. El objetivo del presente trabajo fue optimizar un método para la degradación de lignocelulosa a glucosa por acción de *Stenotrophomona maltophilia*. Se planteó un diseño de experimentos 2^k; se estudiaron los efectos generados por la condición de la paja de trigo, medio de cultivo y la bacteria, generando 8 diferentes tratamientos. Se inoculó la PT con *S. maltophilia* a 30±2 °C por 5 días. Posteriormente, se midió la cantidad de azúcares generados en cada tratamiento por espectrometría UV-vis, además se estudiaron las PT por SEM. Se observó que existe relación entre la condición de la PT, la bacteria y la degradación de lignocelulosa, pues en los tratamientos inoculados se encontró mayor concentración de azúcares.

Abstract

In recent years, the production of biofuels as a source of renewable energy has been prioritized, expecting reduce the negative impact of CO₂ emissions. Nowadays, the main focus is on finding efficient enzymes and microorganisms to produce bioethanol from lignocellulolytic biomass. The goal of this research is optimize a lignocellulose degradation mechanism using *Stenotrophomona maltophilia*. The experiment was performed with a 2^k factorial design, monitoring the effect of the wheat straw's (WS), the bacteria's and the growth medium's condition, 8 different treatments were used. The WS was inoculated with *S. maltophilia* at 30±2 °C for 5 days. The production of reducing sugars was evaluated using UV-vis spectroscopy, also the WS were analyzed by SEM. The result showed a relationship between WS, bacteria condition and lignocellulose degradation, inoculated treatments gave a higher quantity of glucose.

Palabras Clave

Azúcares reductores; bioprocesamiento consolidado; lignocelulosa; paja de trigo (PT);
Stenotrophomonas maltophilia.

INTRODUCCIÓN

Biocombustibles

En la actualidad, la bioenergía se ha considerado una alternativa de mucho peso para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, propios de la quema de combustibles fósiles. Gracias al avance las tecnologías de extracción, hoy es posible obtener biocombustibles en forma sólida, líquida y gaseosa, a partir de diversos recursos naturales como madera, maíz, trigo, semillas oleaginosas y desechos, entre otros.

Se entiende por “biocombustible” a aquellos combustibles que se obtienen de biomasa; es decir, de cualquier materia orgánica que haya tenido su origen inmediato en el proceso biológico de organismos recientemente vivos, como plantas, o sus desechos metabólicos (estiércol); pueden ser productos de origen animal o vegetal. Este término se usa para denominar al conjunto de productos energéticos, también llamados biocarburantes, como alcoholes, éteres, ésteres y otros químicos, provenientes de compuestos orgánicos de base celulósica extraída de plantas silvestres o de cultivo. [1]

El principal objetivo de implementar esta fuente de energía alternativa es la sustitución de la gasolina en los medios de transporte, lo que permite reducir las emisiones de CO₂ en la atmósfera. Los biocombustibles más producidos son el bioetanol y el biodiésel, aunque también se ha implementado el uso de biopropanol y biobutanol en menor medida.

Obtención de biocombustibles

A partir de la naturaleza de la materia orgánica, su aprovechamiento energético y el uso para el cuál será destinado, son empleados distintos métodos para la obtención de los biocombustibles, como:

- Procesos mecánicos: incluye técnicas de astillado, trituración y compactación. Los productos son aplicados para calefacción y obtención de energía eléctrica.

- Procesos termoquímicos: a partir de pirolisis o gasificación, se obtiene aceite, gasógeno y carbón; para su uso en el transporte, industria química, y obtención de energía eléctrica.
- Procesos biotecnológicos: usando fermentación y digestión biológica se obtiene etanol y biogás, que se destinan a la industria del transporte, química y eléctrica.
- Procesos extractivos: se realizan extracciones físico-químicas con el fin de obtener aceites, ésteres e hidrocarburos, aprovechados en el transporte y la industria química.

Actualmente existen importantes aplicaciones de la biotecnología industrial para el desarrollo de insumos y tecnologías de proceso que apoyen la producción de biocombustibles como el bioetanol, biodiesel y biobutanol. Los mayores esfuerzos se concentran en el desarrollo y aislamiento de enzimas, bacterias y levaduras adecuadas para la obtención de bioetanol de biomasa celulósica.

La producción de bioetanol celulósico, debido a las características estructurales de la celulosa (resistencia a la degradación) requiere de un consumo elevado de enzimas, superior al necesario para la producción de bioetanol a partir del almidón o del azúcar. [2]

Las investigaciones actuales se orientan al bioprocesamiento consolidado, es decir, se busca obtener todas las enzimas requeridas para la descomposición de la celulosa en azúcar y para los procesos de fermentación usando la misma comunidad microbiana en el mismo reactor de bioprocesos. Reduciendo así costos y mejorando la sustentabilidad de los biocombustibles.

Stenotrophomonas maltophilia

Este microorganismo es un bacilo Gram negativo, no formador de esporas, no encapsulado, oxidasa negativo, lisina decarboxilasa positivo, móvil por flagelación polar lofotríca, Indol negativo, que no reduce nitratos, DNAsa positivo, oxida glucosa y maltosa. [3]

Las colonias en agar sangre son de color café-grisáceo o color lavanda (por producción de pigmentos solubles) además de olor amoniacal; en Agar MacConkey las colonias son transparentes lactosa negativa.

El género *Stenotrophomonas* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, se aísla de humanos, alimentos y muchas fuentes ambientales; como cuerpos de agua (ríos, pozos, lagos, aguas negras), y suelos de uso agrícola. Es considerado un patógeno oportunista.

Justificación

Para la realización del proyecto se ha considerado que la paja de trigo (PT) es uno de los residuos lignocelulósicos más abundantes del país teniendo una gran producción al sur del estado de Guanajuato [4] y que la bacteria *S. maltophilia* presenta una amplia aplicación de procesos industriales, ambientales y agrícolas debido a su gran capacidad para metabolizar compuestos orgánicos.

Este trabajo se enfoca en la transformación de paja de trigo en azúcares fermentables mediante la utilización de *S. Maltophilia* para su posterior fermentación en etanol. La investigación pretende además explorar la intensificación del proceso de producción de etanol mediante la reducción de las etapas de pretratamiento e hidrólisis a una sola etapa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del inóculo

Se trabajó con la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* previamente aislada de suelo de jardín de Irapuato, Guanajuato. Se preparó medio de cultivo con levadura, dextrosa, y buffer para mantener un pH de 7; para la inoculación de la bacteria. El inóculo se dejó en incubación a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 72 horas.

Evaluación de diversas condiciones de cultivo para *S. maltophilia*

Se realizó un diseño de experimentos factorial 2^k , La Tabla 1, muestra los factores y niveles

Tabla 1: Diseño del experimento y condiciones de los tratamientos de la paja de trigo.

Diseño de experimento				
Factores	Niveles			
	-	+		
Medio de Cultivo	No esterilizado	Esterilizado		
M.O.*	Ausente		Presente	
Paja de trigo	No esterilizada		Esterilizada	
Tratamiento	Niveles		Condiciones	
1	-	-	-	Medio no esterilizado, m.o. ausente, paja no esterilizada
2	+	-	-	Medio esterilizado, m.o. ausente, paja no esterilizada
3	-	+	-	Medio no esterilizado, m.o. presente, paja no esterilizada
4	+	+	-	Medio esterilizado, m.o. presente, paja no esterilizada
5	-	-	+	Medio no esterilizado, m.o. ausente, paja esterilizada
6	+	-	+	Medio esterilizado, m.o. ausente, paja esterilizada
7	-	+	+	Medio no esterilizado, m.o. presente, paja esterilizada
8	+	+	+	Medio esterilizado, m.o. presente, paja esterilizada

*M.O.= Microorganismo

Se desarrollaron 8 experimentos con matraces Erlenmeyer de 120 ml c/u. Usando 30 ml de medio de cultivo por matraz. Se trabajó por triplicado.

Al matraz se le añade 0.5g de PT y 10% de inóculo de *Stenotrophomonas maltophilia* (3 mL). Se incubaron los matraces a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5 días, considerando la cinética de la bacteria, y se

mantuvieron en el agitador orbital marca LABNET a 100 rpm.

Determinación de azúcares reductores por el método de Miller (DNS).

Se tomaron 500 μL de muestra del sobrenadante líquido de cada matraz.

Se realizaron soluciones patrón de dextrosa de concentraciones 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 y 2 mg/mL, para realizar la curva estándar de medición. [5]

Para el estudio de las muestras tratadas fue necesario hacer diluciones, ya que los azúcares están muy concentrados y no se ajustan a la curva de calibración. Se centrifugaron las muestras a 2000 rpm por 2 min y se tomó parte del sobrenadante. Las dos diluciones realizadas para las muestras fueron 1:10 y 1:20.

- 1:10 por 100 μL de muestra, se agregan 900 μL de agua destilada.
- 1:20 por 50 μL de muestra, se agregan 950 μL de agua destilada.

Para la medición de absorbancia en el espectrofotómetro UV-vis, se tomaron 50 μL de las muestras diluidas y 50 μL de DNS, y se colocaron en tubos eppendorf de 1 mL.

La muestra blanco de medición se preparó con 540 μL de DNS.

Los tubos eppendorf se llevaron a calentamiento (en agua hirviendo) por 5 min y se dejaron enfriar, después se diluyeron con 500 μL de agua destilada.

Se colocaron en celdas de acrílico de 10 mm para realizar la medición con una absorbancia de 540 nm. El espectrómetro utilizado es de la marca Eppendorf.

Estudio de la paja tratada por SEM

Se extrajo una alícuota de paja de cada experimento. Se lavó con una solución de HCl 0.05 M para detener la actividad bacteriana y se secó a 60 °C.

Se obtuvieron imágenes en el equipo SEM (Microscopio Electrónico de Barrido), de las pajas

con los tratamientos 2, 4, 6 y 8. Modelo JSM-7800F, de la marca JEOL.

Se analizaron las pajas con los tratamientos 2, 4, 6 y 8, en un equipo de difracción de rayos X. El equipo, modelo D2PHASER, de la marca BRUKER; fue operado con CuK generado a 40 kV y 30 mA lo que da una longitud de onda de 1.54 Å. El rango de scan fue de 10° a 45° (2 theta). La velocidad de barrido fue 2° 2 θ /min y 0.02°. [6]

Se estudiaron las pajas de los tratamientos 1 al 8, por Espectroscopia RAMAN, con un rango de 300 a 3300 nm, y potencia de 15 mW. Modelo DXR, de la marca Thermo Fisher Scientific.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 2: Resultados de las mediciones de azúcares reductores por el método de Miller (DNS).

Tratamiento	Dilución	Concentración (mg/mL)	Absorbancia a 540 nm
1	1:10	0.772	0.938
2	1:10	0.795	0.968
3	1:10	0.801	0.976
4	1:10	0.767	0.933
5	1:20	0.901	0.636
6	1:20	0.915	0.646
7	1:20	1.331	0.944
8	1:20	1.336	0.947

La Tabla 2, nos muestra las mediciones de los 8 tratamientos. A partir de los valores de absorbancia, obtenidos en el espectrómetro UV-visible, se realizó el cálculo de la concentración (mg/mL) de las muestras, en base a la curva de calibración (Miller, 1959).

En la Figura 1, se muestra el resultado de graficar los tratamientos en base a su concentración de azúcares reductores (mg/mL).

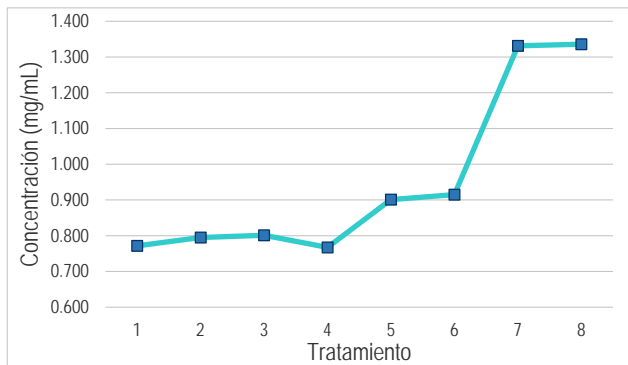


Figura 1: Gráfica lineal que muestra los valores de las concentraciones (mg/mL) de azúcares reductores en los diferentes tratamientos.

Se observa que el tratamiento con menor cantidad de azúcares es el tratamiento 4, éstos matraces (con PT sin esterilizar) se contaminaron con hongos, es probable que la competencia por nutrientes de hongos-bacterias esté impidiendo el desarrollo de *S. maltophilia* y por lo tanto no ocurrió la hidrólisis de lignocelulosa, se sugiere para próximos experimentos añadir agentes antifúngicos para evitar la contaminación. El tratamiento con mayor cantidad de azúcares reductores fue el correspondiente al número 8, dónde estaba presente la bacteria y fue más evidente su desarrollo, aparentemente éste fue el tratamiento más efectivo para hidrolizar la PT.

La Figura 2, corresponde a una imagen obtenida por SEM, se puede apreciar la superficie de la PT del tratamiento 8, se pueden observar algunos bacilos en esta porción de la paja, es probable que correspondan a la bacteria *S. maltophilia*, que fueron fijadas por el lavado con HCl y el calor del secado, y generado por el equipo SEM.

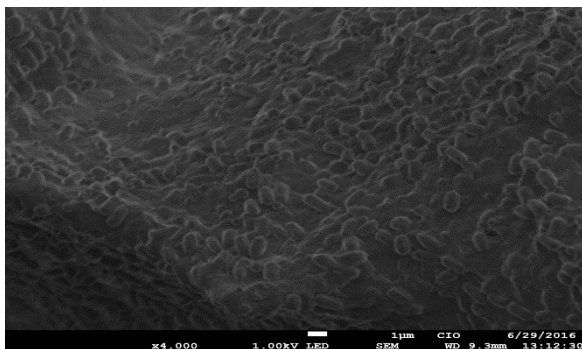


Figura 2. Parte de la superficie de paja de trigo del tratamiento 8, observada en el SEM (x4,000), dónde se infiere hay bacterias fijadas, después del lavado (HCl) y secado.

En un trabajo futuro se discutirán los resultados arrojados de la Espectroscopia RAMAN y difracción de rayos X, pues los resultados requieren mayor análisis.

CONCLUSIONES

Se experimentó con diferentes condiciones para lograr la hidrólisis de la PT; de acuerdo a la respuesta obtenida en el diseño de experimentos, se considera que la condición de la paja afecto la actividad metabólica de la bacteria, ya que después de realizar un ANOVA se obtuvo un valor de p menor α , y se rechaza la hipótesis nula. También se comprobó que la presencia de la bacteria genera un efecto positivo en la producción de azúcares. Se sugiere identificar los otros m.o. que se desarrollaron en el medio de cultivo y que posiblemente intervinieron en la degradación de lignocelulosa. En trabajos futuros se planea el escalamiento en reactores para la producción del biocombustible.

REFERENCIAS

- [1] Salinas, E. & Gasca, V. (2009). Los biocombustibles. El Cotidiano, 157(9), 75-82.
- [2] Goldstein, E. & Gutman, G. (2010). Biocombustibles y biotecnología. Contexto internacional, situación en Argentina. CONICET, 1(4), 1-12. Recuperado de: <http://www.ceur-conicet.gov.ar/imagenes/biocombustibles2.pdf>
- [3] Helguero, T. (2010). Bacilos Gram negativos no fermentadores: Pseudomonas, Stenotrophomonas, Acinetobacter, Burkholderia. Vigilancia, prevención y control de infecciones asociadas a los servicios de salud, 1(1), 319-340.
- [4] Valdez, I., Acevedo, J. & Hernández, C. (2010). Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14, 2147-2152.
- [5] Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31, 426-428.
- [6] Valdez, I., Pérez, M., Tapia, A., Buitrón, G., Molina, C., Hernández, G., Amaya, L. (2015). Hydrogen and butanol production from native wheat straw by synthetic microbial consortia integrated by species of *Enterococcus* and *Clostridium*. Fuel, 159, 214 -222.