



Obtención de Celulasas bacterianas utilizando residuos de verduras procedentes de plazas de mercado

Obtaining bacterial cellulases using vegetable waste from marketplaces

Luna Julieth Manrique Mateus

Luna.manrique11@misena.edu.co; Semillero de Investigación en Biotecnología CGI, Centro de Gestión Industrial, Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Colombia

Diego Hernandez

dahernandez200@misena.edu.co ; Semillero de Investigación en Biotecnología CGI, Centro de Gestión Industrial, Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Colombia

Danna Monrroy

dcomonroy03@misena.edu.co; Semillero de Investigación en Biotecnología CGI, Centro de Gestión Industrial, Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Colombia

Yury Andrea Peña Betancourth

yapena9143@misena.edu.co; Semillero de Investigación en Biotecnología CGI, Centro de Gestión Industrial, Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Colombia

Etna Milena Sánchez

etnamilena@misena.edu.co; Semillero de Investigación en Biotecnología CGI, Centro de Gestión Industrial, Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Colombia

Jaquelin Mojica Gómez

jmojica06@misena.edu.co; Semillero de Investigación en Biotecnología CGI, Centro de Gestión Industrial, Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Colombia

Resumen

Las plazas de mercado son generadoras de residuos orgánicos que pueden ser valorizados mediante su inclusión en cadenas productivas biotecnológicas como la producción de enzimas a partir de sustratos de bajo costo. El objetivo de este estudio fue obtener celulasas bacterianas a partir de residuos de verduras generados en la plaza de mercado El Restrepo - Bogotá. Se formuló un sustrato utilizando residuos de verduras y se inoculó con la cepa bacteriana C6M2, monitoreando la actividad enzimática, el contenido de azúcares reductores y la celulosa residual por 72 horas. La mayor actividad enzimática fue observada a las 33 horas (22,40 U/mL).

Durante la fermentación se observó una disminución de azúcares reductores desde 0.43 g/mL hasta 0,032g/mL y de celulosa residual del 92,5% al 3,1 %. Esto permite concluir que los residuos de verduras pueden ser incluidos en procesos de economía circular como sustratos para la obtención de celulasas.

Palabras clave: Azúcares reductores, Celulosa, Biorefinería, biomasa, biomoléculas, enzimas, economía circular

Abstract

Market places generate organic waste that can be valued by including it in biotechnological production chains such as the production of enzymes from low-cost substrates. The objective of this study was to obtain bacterial cellulases from vegetable residues generated in the El Restrepo marketplace - Bogotá. A substrate was formulated using vegetable residues and inoculated with the C6M2 bacterial strain, monitoring the enzymatic activity, the content of reducing sugars and the residual cellulose for 72 hours. The highest enzymatic activity was observed at 33 hours (22.40 U/mL).

During fermentation, a decrease in reducing sugars was observed from 0.43 g/mL to 0.032 g/mL and residual cellulose from 92.5% to 3.1%. This allows us to conclude that vegetable waste can be included in circular economy processes as substrates for obtaining cellulases.

Keywords: Reducing sugars, Cellulose, Biorefinery, biomass, biomolecules, enzymes, circular economy

Introducción

En Colombia, las plazas de mercado son generadores de residuos vegetales que pueden ser valorizados como materia prima en diferentes procesos de economía circular (Fernández, Duque, & Valderrama, 2019). Estos residuos corresponden al 61.5 % de la generación de residuos; los cuales debido a su incorrecta disposición producen una mezcla de gases conocida como biogás (CONPES, 2016). Estos residuos generalmente contienen celulosa, polímero lineal compuesto por unidades de glucosa unidas a través de enlaces de tipo β -1,4 y presente en las fibras de las plantas, siendo el compuesto orgánico natural más abundante (Sundarraj A, & Ranganathan T., 2018).

Las celulasas son enzimas que hidrolizan la celulosa, degradandola hasta glucosa libre, que posteriormente puede ser empleada en diversos procesos (Llenque-Díaz et al., 2015). Estas se utilizan en la industria de biocombustibles, en la industria de la pulpa y el papel y en la industria textil en el bio-acabado y bio-pulido de tejidos (Singh et al., 2016).

Las celulasas pueden producirse a partir de bacterias y hongos (Llenque-Díaz et al., 2015).

Su producción depende mayoritariamente de la fuente de carbono, su degradabilidad, composición y el acceso de los microorganismos a los sustratos (Aparna & Anu, 2022). En el país, ha surgido la necesidad de producir enzimas a partir de materiales de bajo costo dada su gran aplicación en procesos industriales, es por esto que los residuos generados en las plazas de mercado se vuelven una de las materias primas principales para esta extracción (Montor et al., 2006).

El objetivo de este estudio es mostrar una alternativa para el aprovechamiento de residuos de verduras como sustratos para la obtención de celulasas bacterianas, utilizando así materia prima de bajo costo evitando su desperdicio y mejorando su manejo.

Materiales y métodos

1. Muestreo y acondicionamiento de residuos

Se recolectaron residuos de verduras como lechuga, tallos de cebolla, acelgas y espinacas (R6) por el método de cuarteo y posteriormente en el laboratorio fueron lavados, troceados y secados a 105°C.

2. Elaboración de sustrato

Se prepararon 800 mL de sustrato con (NH₄)₂SO₄ 1,2291g; KH₂PO₄ 1,5g; UREA 0,2634g; CaCl₂·2H₂O 0,4 g; MgSO₄ 0,3g; Peptona 0,6584g, 1mL de solución de microelementos y 21,74 g de R6. El pH se ajustó a 7,0 y se esterilizó a 115°C por 7 minutos

3. Procesos de fermentación

Se prepararon 50 mL de inóculo con 6,5 x 10⁸ células/mL a partir de la cepa bacteriana C6M2 (aislada previamente de residuos vegetales) y se llevó al sustrato elaborado con R6; se incubó por 72 horas a 37°C y 150 rpm. La obtención del extracto enzimático se realizó a las 10, 24, 33, 48 y 72 horas de la fermentación, centrifugando a 4500 rpm por 30 minutos y 7°C. Con el sobrenadante se evaluó el contenido de azúcares reductores y la actividad enzimática y con el pellet la celulosa residual.

4. Determinación de Azúcares Reductores

Los azúcares reductores se determinaron por el método espectrofotométrico de DNS (Sözgen, et al. 2016), utilizando un lector de placas BIOTEK.

5. Determinación de actividad enzimática

La actividad se determinó a 50°C y a pH 7.0 de acuerdo con Heredia & Sánchez (2021).

6. Determinación de Celulosa residual

El pellet se secó a 105°C y se sometió a doble reflujo por 1 hora a 120°C en termoreactor. El primero con CH₃COOH - HNO₃ (10:1) y el segundo con NaOH al 17,5%. En ambos casos se centrifugó y se lavó con agua destilada hasta pH neutro. El residuo sólido se secó a 105°C hasta peso constante y se determinó el contenido de celulosa.

Resultados y discusión

• Azúcares Reductores

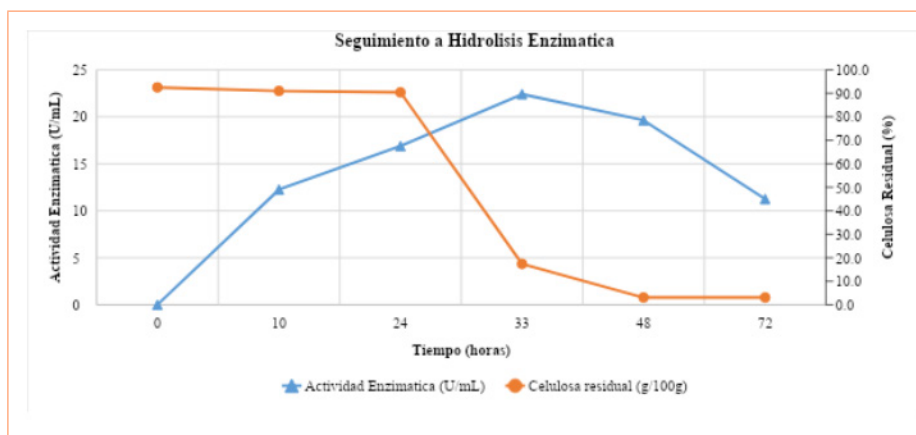
Los azúcares reductores presentaron una concentración inicial de 0,43 g/mL en el medio de fermentación la cual se mantuvo hasta la hora 10, a partir de las 24 h (0,39 g/mL) se presentó una disminución hasta las 33h (0,34 g/mL). A las 48 h se evidenció un aumento a 0,38 g/mL y a las 72 h se encontraron 0,032g/mL. El cambio en el contenido de azúcares durante la fermentación se debe probablemente a su consumo por parte de la población bacteriana C6M2

• Actividad enzimática y Celulosa Residual

La figura 1 presenta los resultados de la actividad enzimática de las celulasas producidas en el medio formulado con residuos de verduras y el porcentaje de celulosa residual presente en el sustrato durante las 72 horas de fermentación. En el período inicial se evidencia la disminución en la concentración de azúcares reductores coincide tanto con el aumento en

la producción de celulasas, la cual presentó su mayor pico a la hora 33 (22,40 U/mL) como con la disminución constante de celulosa residual. (Figura 1). Lo anterior sugiere que la cepa bacteriana C6M2 empieza a producir celulasas una vez el azúcar presente en el sustrato de fermentación ha disminuido para obtener energía a partir de la celulosa presente en el medio. El sustrato formulado a partir de residuos de verduras y la cepa bacteriana C6M2 permitió la producción de celulasas con mayor actividad enzimática (22,40 U/mL) en comparación con las reportadas en otros estudios en los que se usó bagazo de caña como sustrato y *Bacillus* sp como microorganismo productor. 0,34 U/mL (Bala, Kalaichelvan, & Santhi, 2015) y 2,24 U/mg (Pramanik et al., 2020);

Figura 1. Actividad enzimática y celulosa residual durante la obtención de celulasas por vía fermentativa



Conclusiones

Los resultados del presente estudio demuestran que los residuos de verduras generados en la plaza de mercado El Restrepo pueden ser valorizados como sustratos para la obtención de celulasas bacterianas que a su vez pueden ser utilizadas para obtener otros bioproductos a partir de esta biomasa residual, favoreciendo así los procesos de economía circular y la disminución de impactos ambientales.

Agradecimientos

Al Centro de Gestión Industrial del Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA- CGI) y al Sistema de Investigación, Innovación y Desarrollo Tecnológico (SENNOVA) por la financiación del proyecto SGPS 8493. A los instructores y semilleros del semillero BIOTEC por la dedicación y trabajo constante.

Referencias

- Aparna, D., & Anu, J. (2022). Valorization of Agro-industrial Discards in Fermentation for the Production of Cellulase Enzyme. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 347-354.
- Bala, M., Kalaichelvan, P., & Santhi, R. (2015). Exploitation of Agro-Industrial Wastes as Substrates for Cellulose Production by *Bacillus licheniformis* MTCC 429. *Microbiology Journal*, 36-42.

- Consejo nacional de política económica y social CONPES. (2016). Política Nacional para la Gestión Integral de Residuos Sólidos. Bogotá, D.C.
- Fernández, A., Duque, Y., & Valderrama, C. (2019). Análisis y caracterización del aprovechamiento de residuos vegetales generados en la central de abastos Merca-Neiva. *Revista Ingeniería y Región*, 4-13.
- Heredia J.P., Sánchez, E.M. (2021) Evaluation of sugarcane bagasse and flower stems as substrates for cellulase production by *Bacillus amyloliquefaciens* C18 A. *Research Journal of Biotechnology*. Vol. 16 (1), 144-14
- Llenque-Díaz, L. A., Muñoz Ríos, M., Espejo Vargas, E., & Moreno Ruiz, A. (2015). Producción de celulasas por *Aspergillus niger* a partir de bagazo de caña de azúcar en biorreactor aireado. *Revista Ciencia y Tecnología*, 6781(4), 39–49.
- Montor, J. J., Vinuesa, P., Sachman, B., Olvera, C., & Ventura, S. T. (2006). Productoras De Amilasas Y Celulasas De Suelos De Alto Rendimiento De La Cuenca Del Papaloapan. 2006
- Pramanik, S. K., Mahmud, S., Paul, G. K., Jabin, T., Naher, K., Uddin, M. S., Zaman, S., & Saleh, M. A. (2020). Fermentation optimization of cellulase production from sugarcane bagasse by *Bacillus pseudomycoloides* and molecular modeling study of cellulase. *Current research in microbial sciences*, 2, 100013. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2020.100013>
- Singh R., Kumar M., Mittal A. and Mehta P.K., *Microbial Cellulases in Industrial Applications*, *Ann. Appl. Bio-Sci.*, 3(4), R24 (2016)
- Sözgen, Tütem, Akyüz, Özen, Apak. (2016). Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.049>
- Sundarraaj A., Ranganathan T., (2018). A review on cellulose and its utilization from agro-industrial waste, *Drug Inv. Today*, 10(1), 89