

Análisis de las enzimas con actividad celulolítica de *Streptomyces badius* para la producción de bioetanol

Ingrid Monserrat Gallegos-Olmos, Amanda Rodríguez-Castillo,
Juan Francisco Sánchez-López

Instituto Politécnico Nacional,
Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Guanajuato,
México

igallegosol700@alumno.ipn.mx

Resumen. El bioetanol de segunda generación es un biocombustible que se puede obtener a partir de la fermentación de la biomasa lignocelulósica de residuos agrícolas (maíz, sorgo y trigo). Como parte de su proceso de obtención, se pueden emplear microorganismos con actividades enzimáticas características que permiten la sacarificación de la materia prima. Entre estas enzimas se encuentran: celulasas, hemicelulasas, glucanasas, xilanasas y peroxidasas, principalmente. La cepa M7C3 (*Streptomyces badius*) es una bacteria aislada de los jales mineros de Guanajuato, Gto., de la cual, en este trabajo se analizó su capacidad celulolítica, así como se realizó un análisis bioinformático de las enzimas reportadas en la base de datos del NCBI para esta bacteria. Como parte de los resultados, se encontró que esta cepa fue capaz de crecer en medio mínimo con Carboximetilcelulosa 1% (CMC 1%), presentando un índice de “CMCasa” de 2.5, que está en el rango de las cepas de *Streptomyces* con capacidad celulolítica. Asimismo, se realizó una cinética de crecimiento de esta cepa en medio mínimo líquido con CMC1%, para analizar la actividad celulolítica en los sobrenadantes. Finalmente, se encontró en la base de datos del NCBI que *S. badius* presenta en su genoma genes que corresponden a glicosil hidrolasas (endoglucanasas, glicosidasas, xilanasas), así como peroxidasas, que indicarían que este microorganismo presenta la maquinaria lignocelulolítica necesaria en el proceso de producción de bioetanol.

Palabras clave: Bioetanol, *Streptomyces*, jales mineros, Guanajuato.

Analysis of Enzymes with Cellulolytic Activity of *Streptomyces Badius* for the Production of Bioethanol

Abstract. Second generation bioethanol is a biofuel that can be obtained from the fermentation of lignocellulosic biomass from agricultural waste (corn, sorghum and wheat). As part of its production process, microorganisms with characteristic enzymatic activities can be used that allow the saccharification of the raw material. Among these enzymes are: cellulases, hemicellulases, glucanases, xylanases and peroxidases, mainly. The M7C3 strain (*Streptomyces badius*) is a bacteria isolated from the mining tailings of Guanajuato, Gto., of which, in this work, its cellulolytic capacity was analyzed, as well as a bioinformatic analysis of the enzymes reported in the database was carried out.

from NCBI for these bacteria. As part of the results, it was found that this strain was capable of growing in minimal medium with 1% Carboxymethylcellulose (1% CMC), presenting a "CMCase" index of 2.5, which is in the range of *Streptomyces* strains with the capacity cellulolytic. Likewise, growth kinetics of this strain were carried out in liquid minimal medium with CMC1%, to analyze the cellulolytic activity in the supernatants. Finally, it was found in the NCBI database that *S. badius* has genes in its genome that correspond to glycosyl hydrolases (endoglucanases, glycosidases, xylanases), as well as peroxidases, which would indicate that this microorganism has the lignocellulolytic machinery necessary in the process of bioethanol production.

Keywords: Bioethanol, *Streptomyces*, mining tailings, Guanajuato.

1. Introducción

Un biocombustible es una fuente de bioenergía renovable, obtenido mediante la biomasa de microorganismos o generado a través de diversos procesos biológicos. Este producto posee diversas ventajas, ya que al ser biodegradable presenta características sostenibles y su combustión está determinada mediante el ciclo del dióxido de carbono.

El bioetanol de segunda generación es un biocombustible que puede ser obtenido a partir de la fermentación de la biomasa lignocelulósica de residuos agrícolas (maíz, trigo y sorgo) compuestos por celulosa, hemicelulosa y lignina; en su proceso de obtención se requiere de un pretratamiento de la materia prima donde se deslignifica.

2. Resultados y discusión

La cepa M7C3 identificada molecularmente como *Streptomyces badius* por nuestro grupo de trabajo [4], es una bacteria que ha sido reportada como productora de enzimas degradadoras de celulosa o lignocelulosa [6]. Por su parte otras bacterias han sido reportadas con esta capacidad como lo son *Streptomyces argenteolus* [7]; *Streptomyces griseorubens* [8]; *Streptomyces lividans* [9] y *Streptomyces viridosporus* [10]. La determinación de la hidrólisis celulolítica mediante la tinción con Rojo Congo, es una técnica que consiste en la asociación del colorante Rojo Congo con la zona de acción de las enzimas celulolíticas.

Cuando en el sitio está presente la celulosa, el colorante se mantiene unido a ella, es decir, a las regiones donde hay enlaces β -1,4- D-glucanos, generando una intensa coloración que se desvanece ante la actividad despolimerizante de las celulasas [11]. En la figura 1A se observan los resultados obtenidos con la tinción por Rojo Congo, en donde aparecen zonas de aclaramiento alrededor de la colonia, lo cual nos determina la capacidad celulolítica de *S. badius*.

Con estos datos se determinó el índice de la actividad enzimática (ICMC), el cual es un método que determina la capacidad de producir "CMCas" (Endo-1,4- β -D-glucanasas) obteniendo un valor de para M7C3, el cual coincide con el obtenido para otras especies de *Streptomyces* a los 7 días de crecimiento, que oscilan entre 2 y 2.8 [12]. Por otra parte, en la figura 1B se determinó las proteínas totales del sobrenadante producidas por la cepa M7C3 en medio mínimo líquido con CMC 1%, detectando un máximo de proteínas a los 9 días en el sobrenadante de este medio de cultivo, el cual es

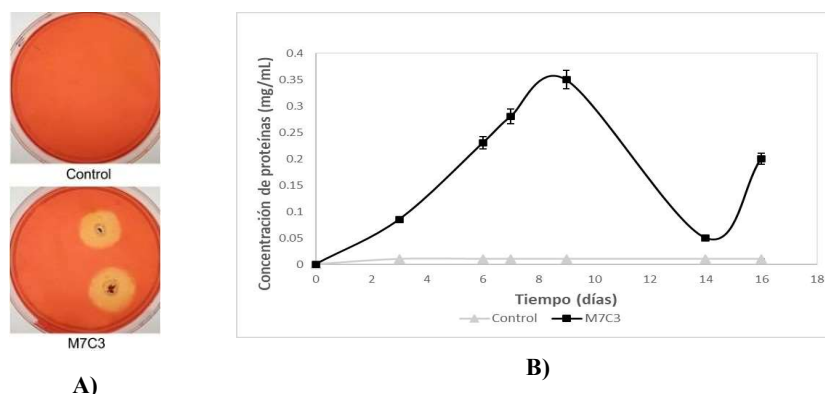


Fig. 1. A) Tinción con Rojo Congo para *S. badius*. B) Concentración de proteína extracelular de la cepa M7C3 cultivada en CMC 1%.

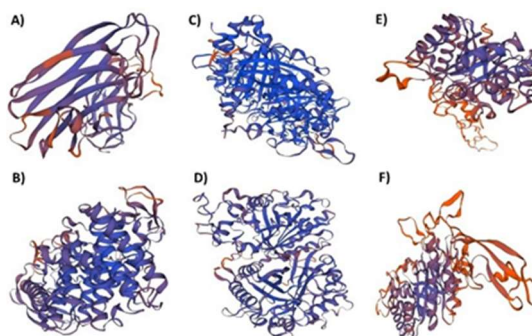


Fig. 2. Modelado en 3D para las enzimas celulolíticas presentes en *S. badius*. A) glucósido hidrolasa familia 9 WP_199888086.1 (852 aa); B) endoglucanasa GGS46745.1 (936 aa); C) peroxidasa tipo Dyp WP_199888640.1 (381 aa); D) peroxidasa RAN18503.1 (451 aa); E) endo beta 1,4 xilanasa WP_253265217.1 (568 aa); F) glicosil hidrolasa RAN13377.1 (581 aa).

un resultado similar al reportado por Acosta Rodríguez *et al.* [13]. Para degradar el material lignocelulolítico presente en el residuo agroindustrial, los microorganismos requieren de la acción conjunta de endoglucanasas, exoglucanasas, β -D-glucosidasas, xilanasas y peroxidasas, lacasas y feruloil esterases [9, 10].

En la figura 2 se muestra la estructura 3D obtenida para las enzimas celulolíticas de *S. badius*, encontradas en la base de datos del NCBI, con lo cual se muestra que esta bacteria estaría equipada con las enzimas requeridas para la biodegradación del material lignocelulolítico.

3. Conclusión

Se detectó actividad celulolítica sobre CMC 1% en la cepa M7C3 de *S. badius* aislada de los jales mineros de Guanajuato, Gto. Se encontró también que esta bacteria posee la maquinaria de degradación del material lignocelulolítico.

Agradecimientos. Agradecemos al Instituto Politécnico Nacional, por el apoyo otorgado al Proyecto de Investigación SIP 20220926.

Referencias

1. Gaurav, N., Sivasankari, S., Kiran, G. S., Ninawe, A., Selvin, J.: Utilization of bioresources for sustainable biofuels: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 73, pp. 205–214 (2017) doi: 10.1016/j.rser.2017.01.070
2. Chen, H., Fu, X.: Industrial technologies for bioethanol production from linocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 57, pp. 468–78 (2016) doi: 10.1016/j.rser.2015.12.069
3. Vohra, M., Jagdish, M., Rahul, M., Satish, P., Sanjay, P.: Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 2, no. 1, pp. 573–584 (2014) doi: 10.1016/j.jece.2013.10.013
4. Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., Gulati, A.: A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology*, Springer link, vol. 57, pp. 503–507 (2008) doi: 10.1007/s00284-008-9276-8
5. Phelan, M. B., Crawford, D. L., Pometto III, A. L.: Isolation of lignocellulose decomposing actinomycetes and degradation of specifically ¹⁴C-labeled lignocelluloses by six selected *Streptomyces* strains. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 25, no. 11, pp. 1270–1276 (1979) doi: 10.1139/m79-200
6. Ventrino, V., Ionata, E., Birolo, L., Montella, S., Marcolongo, L., de Chiaro, A., Espresso, F., Faraco, V., Pepe, O.: Lignocellulose adapted endocellulase producing: *Streptomyces* strains for bioconversion of cellulose-based materials. *Frontiers in Microbiology*, vol. 7 (2016) doi: 10.3389/fmicb.2016.02061