



ESTUDIO DE MICROORGANISMOS PROVENIENTES DE JALES MINEROS DE GUANAJUATO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL.

Ingrid Monserrat Gallegos Olmos^{a*}, Juan Francisco Sánchez López^a, Aurelio Álvarez Vargas^b y Carmen Cano Canchola^b.

^aInstituto Politécnico Nacional - Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Guanajuato. Silao, Gto. México. C.P. 36275.

^bUniversidad de Guanajuato. Departamento de Biología. División de Ciencias Naturales y Exactas. Guanajuato, Gto. México. C.P. 36000.

igallegoso1700@alumno.ipn.mx*

Resumen

El bioetanol de segunda generación se obtiene a partir del pretratamiento, sacarificación y fermentación de residuos agroindustriales como lo serían los desechos de sorgo, trigo y maíz, cuya producción en Guanajuato representa el 22%, 13% y 5% a nivel nacional. En este proyecto se emplearán microorganismos aislados de jales mineros, los cuales ofrecerían ventajas como la resistencia a metales pesados. Se emplearán extractos enzimáticos de CH2 (*Cladosporium sp.*), CH6 (*Rhizopus sp.*), CH8 (*Penicillium sp.*) y CH10 (*Purpureocillium sp.*), así como de M7C3 (*Streptomyces sp.*). El extracto se obtendrá al crecer a los microorganismos en medio mínimo líquido con CMC al 1% como fuente de carbono. Estos extractos se emplearán en el proceso de sacarificación de sorgo, trigo y maíz; previamente secado, molido y pretratado con H₂O₂ al 2%. La fermentación se realizará con una cepa de referencia de *S. cerevisiae*. El bioetanol producido se cuantificará por el método de dicromato. En el presente trabajo se muestra que los microorganismos poseen actividad celulolítica, determinada mediante cinéticas de crecimiento en CMC al 1%, medición de azúcares reductores por DNS y degradación de CMC detectada con rojo Congo.

Palabras clave: Bioetanol; microorganismos; jales mineros; Guanajuato.



STUDY OF MICROORGANISMS FROM MINING TAILINGS OF GUANAJUATO FOR THE PRODUCTION OF BIOETHANOL.

Abstract

Second-generation bioethanol is obtained from the pretreatment, saccharification and fermentation of agro-industrial waste such as sorghum, wheat and corn waste, whose production in Guanajuato represents 22%, 13% and 15% at the national level. In this project, microorganisms isolated from mining tailings will be used, which would offer advantages such as resistance to heavy metals. Enzymatic extracts of CH2 (*Cladosporium sp.*), CH6 (*Rhizopus sp.*), CH8 (*Penicillium sp.*) and CH10 (*Purpureocillium sp.*), as well as M7C3 (*Streptomyces sp.*) will be used. The extract will be obtained by growing the microorganisms in minimal liquid medium with 1% CMC as carbon source. These extracts will be used in the saccharification process of sorghum, wheat, and corn; previously dried, ground and pretreated with 2% H₂O₂. The fermentation will be conducted with a reference strain of *S. cerevisiae*. The bioethanol produced will be quantified by the dichromate method. In the present work it is shown that the microorganisms have cellulolytic activity, determined by growth kinetics in CMC at 1%, measurement of reducing sugars by DNS and CMC degradation detected with Congo red.

Keywords: Bioethanol; microorganisms; mining tailings; Guanajuato.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biocombustibles

Un biocombustible es una sustancia química generada a partir de procesos biológicos o derivado de la biomasa de microorganismos, Su naturaleza puede ser en forma líquida, sólida o gaseosa (Rodionova y col., 2017).

Gaurav y col. (2017), señalan que un biocombustible posee diversas ventajas, debido a que se extrae de la biomasa de los microorganismos, tiene características sostenibles al ser biodegradable, así como una combustión basada en el ciclo del CO₂.

En México, los biocombustibles tienen una gran importancia debido a que son una fuente de bioenergía con mayor eficacia en comparación con otras fuentes de energía renovable (Vargas-Hernández y col., 2016).

Zamudio (2018), menciona que existen cuatro generaciones de biocombustibles, dependiendo de la materia prima que se emplea (primera y segunda generación) o también acerca de la tecnología que se emplea para producirlos (tercera y cuarta generación).

Este proyecto se enfoca a la producción de bioetanol de segunda generación, empleando microorganismos aislados de jales mineros.



1.2. Biocombustibles de segunda generación.

Para producir un biocombustible de segunda generación, se requiere emplear nuevas alternativas de materia prima para generarlos, ya que se busca emplear residuos agrícolas y forestales (biomasa lignocelulósica) compuestos por celulosa tales como rastrojo de maíz, paja de trigo, bagazo de caña, entre otros (Zamudio, 2018).

Para poder producir biocombustibles, participan rutas bioquímicas como lo son la hidrólisis enzimática y la fermentación, mientras que por rutas termoquímicas se el proceso implicaría operaciones como pirólisis, gasificación y síntesis de Fischer-Tropsch (Zamudio, 2018).

1.3. Fermentación de la biomasa vegetal

El bioetanol es un combustible líquido renovable, que proviene de la fermentación de la biomasa. Al ser de origen vegetal, se disminuyen las emisiones de gases de efecto invernadero, así como la producción de dióxido de carbono (Gupta y Prakash 2015).

La principal desventaja que representa es que la materia prima utilizada requiere ser obtenida del sector alimenticio como el bioetanol de primera generación; así como la ineficiencia de la conversión de azúcares a bioetanol, ya que se han reportado que se obtiene entre el 4 y 10% en peso (Kiss y col., 2014).

1.4. Producción de bioetanol

La mayor producción de bioetanol se lleva a cabo a través de procesos fermentativos (Bajpai, 2013; Baeyens y col., 2015).

Después de la fermentación, se obtiene bioetanol muy diluido por lo que es necesario utilizar algún método de separación para concentrarlo y de esta manera obtener el bioetanol de alta pureza (Zamudio, 2018).

Zamudio (2018), señala que el proceso de producción de bioetanol requiere de tres pasos:

1. Obtención de la solución que contiene los azúcares fermentables.
2. Conversión de los azúcares en etanol mediante la fermentación.
3. Separación y purificación de etanol.

El bioetanol de segunda generación incluye residuos de la agricultura, pastos, residuos de madera, etc. La biomasa lignocelulósica se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina unidas entre ellas en la pared celular de la planta. La lignina une los compuestos y es responsable de dar la rigidez a la materia celulósica. Por ello, hace que sea difícil extraer los azúcares fermentables afectando en la conversión de etanol y por lo tanto en la rentabilidad del proceso (Vohra y col., 2014).

Al ser de segunda generación, el bioetanol requiere de un pretratamiento



de la materia prima en donde se lleva a cabo una deslignificación, para liberar a la celulosa y hemicelulosa; posteriormente se realiza una hidrólisis enzimática, generando azúcares fermentables, finalmente se realiza un proceso de fermentación para convertir a los azúcares en etanol y posteriormente ocurre una deshidratación para obtener el bioetanol concentrado, para que pueda ser empleado como combustible (Chen y Fu, 2016).

El pretratamiento de la materia prima se puede realizar mediante tres tipos de hidrólisis de la celulosa a glucosa:

1. Hidrólisis ácida diluida.
2. Empleando ácido concentrado
3. Hidrólisis enzimática.

La hidrólisis enzimática resulta ser más favorable, ya que se evitan los costos de recuperación al no emplear ácidos, los cuales requerirían de un tratamiento posterior de las aguas residuales generadas (Vohra y col., 2014; Gupta y Prakash, 2015).

Para la fermentación se hace uso de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones anaerobias, así como de bacterias como *Zymomonas mobilis* en condición aeróbica (Vohra y col., 2014).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para este proyecto se emplearán cuatro cepas de hongos filamentosos CH2 (*Cladosporium cladosporoides*), CH6 (*Rhizopus sp.*), CH8 (*Penicillium*

chrysogenum), CH10 (*Purpureocillium lilacinum*) y una cepa bacteriana M7C3 (*Streptomyces badius*), previamente aislados e identificados, de muestras de jales mineros de Guanajuato. Se realizó un cultivo masivo en YPG pH 4.5 para los hongos y en agar nutritivo pH 7.0 para la cepa bacteriana y se incubaron durante 8 días a 28°C. Las esporas fúngicas se recuperaron, filtraron, inocularon e incubaron en medio de cultivo mínimo con carboximetilcelulosa al 1 % (p/v) como fuente de carbono en medio sólido y líquido durante 7 días a 28°C. La actividad enzimática se confirmó mediante tinción con rojo Congo en cultivos en medio sólido. El sobrenadante obtenido en medio líquido se recuperará y concentrará con sulfato de amonio (NH₄)SO₄.

A su vez, se recolectará materia prima (residuos de maíz, trigo y sorgo), la cual se someterá a un proceso de molienda con un molino de martillos y tamizado utilizando malla número 20. El material obtenido se secará en una estufa de aire forzado a 60°C durante 12h. La deslignificación se realizará con el 12% de la masa seca total; así mismo se llevará a cabo el pretratamiento con NaOH 0.4 M y peróxido de hidrógeno 2% durante 60 min a 80°C. El pH se ajustará a 11.5 mediante la adición de ácido clorhídrico concentrado y se dejará reaccionando a pH y temperatura constantes durante 5h. Por otra parte, se obtendrán los extractos enzimáticos a partir de sobrenadantes de cultivos de las cepas a analizar, en medio mínimo líquido con CMC 1%, para su



posterior concentración con sulfato de amonio. Con estos extractos enzimáticos se realizará la sacarificación del deslignificado, midiendo la concentración de azúcares por el método de DNS, los cuales se someterán posteriormente a fermentación con una cepa comercial de *S. cerevisiae*. Se detectará la producción de bioetanol, medida por el método del dicromato, con muestras tomadas a partir del fermentado obtenido.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Morfología colonial de las cepas.

En la figura 1, se observa la morfología colonial de la cepa CH2, en donde se aprecian colonias de color verde olivo, que coinciden con la morfología reportada (Torres y col., 2017).



Figura 1. Morfología colonial de CH2 (*Cladosporium cladosporioides*), después de 12 días de incubación a temperatura ambiente.

En la figura 2, se observa la morfología colonial característica de la cepa CH6, la cual presenta colonias aterciopeladas de color café (Potón y col., 2002).



Figura 2. Morfología colonial de CH6 (*Rhizopus sp.*), después de 12 días de incubación a temperatura ambiente.

En la figura 3, se observa la morfología colonial de la cepa CH8, la cual presenta colonias características de color gris verdoso, con aspecto terroso y bordes blancos, que con el paso del tiempo adquiere una coloración café claro (Samson y col., 1977).



Figura 3. Morfología colonial de CH8 (*Penicillium chrysogenum*), después de 12 días de incubación a temperatura ambiente.

En la figura 4, se observa la morfología colonial de la cepa CH10, la cual presenta colonias características de color morado claro, con aspecto aterciopelado y bordes blancos (Deng y col., 2012).



Figura 4. Morfología colonial de CH10 (*Purpureocillium lilacinum*), después de 12 días de incubación a temperatura ambiente.

En la figura 5, se observa la morfología colonial de la cepa M7C3, la cual forma colonias características de color blanco, de aspecto seco y consistencia dura (Phelan y col., 1979).



Figura 5. Morfología colonial M7C3 (*Streptomyces badius*) después de 7 días de incubación sobre agar nutritivo.

3.2. Morfología celular de las cepas.

En la figura 6, se muestra la morfología celular de la cepa CH6, la cual presenta un micelio con hifas cenocíticas, con abundante presencia de clamidosporas (Potón y col., 2002).

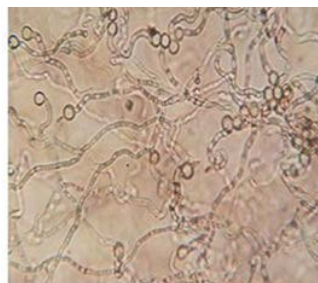


Figura 6. Morfología celular de la cepa CH6 (*Rhizopus* sp.).

En la figura 7, se muestra la morfología celular de la cepa CH8, en la cual se observa micelio con hifas delgadas septadas, la estructura conidial está desarrollada en forma de pedicelos y produce conidióforos como ramas (Samson y col., 1977).



Figura 7. Morfología celular de la cepa CH8 (*Penicillium chrysogenum*).

En la figura 8, se muestra la morfología celular de la cepa CH10, la cual presenta un micelio con hifas delgadas septadas, sin ramificaciones, con conidios aislados de pared lisa, en la punta de la hifa (Deng y col., 2012).



Figura 8. Morfología celular de la cepa CH10 (*Purpureocillium lilacinum*).

En la figura 9, se muestra la morfología celular de la cepa M7C3, en la cual se observan colonias filamentosas, Gram positivas (Phelan y col., 1979).

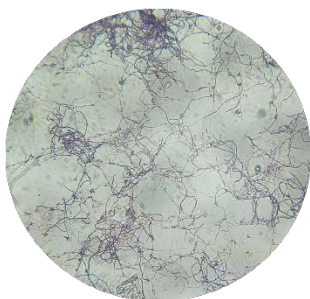


Figura 9. Morfología celular de la cepa M7C3 (*Streptomyces badius*), Tinción de Gram. Imagen tomada con el objetivo 100X.

3.3. Hidrólisis celulolítica.

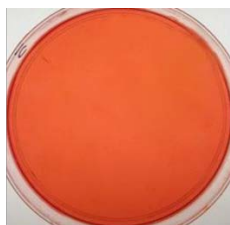
La tinción con rojo Congo es un método que se ha utilizado para detectar la capacidad celulolítica de diversos microorganismos. Esta técnica se basa en la asociación del rojo Congo y la región de acción de las enzimas celulolíticas, puesto que el colorante solo se mantiene unido a las regiones donde hay enlaces entre β -1,4- D-glucanos, generando una intensa coloración que se desvanece ante la actividad despolimerizante de las celulasas (Teather y Wood, 1982).

El índice de actividad enzimática relativa (ICMC) se puede utilizar como un descriptor de bacterias con potencial para producir "CMCasas" (Endo-1,4- β -D-glucanasas) (Wood y Bhat, 1988). Se han informado los siguientes valores para las especies de *Streptomyces* a los 7 días de crecimiento: *Streptomyces globosus* (2.0), *Streptomyces alanosinicus* (2.1), *Streptomyces ruber* (2.8) y *Streptomyces gancidicus* (2.1); estos valores se asemejan a los valores ICMC para las cepas M7C3 (2.5) (figura 10; tabla 1).

Tabla 1. Relación entre el diámetro de la zona de hidrólisis y el diámetro de la colonia.

Cepa	Diámetro de la zona de hidrólisis (mm)	Diámetro de la colonia (mm)	ICMC*
Control	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.9	-
M7C3	25.0 $\pm$ 0.0	10.0 $\pm$ 0.7	2.5

*Índice de actividad enzimática relativa (ICMC): Diámetro de la zona de hidrólisis/ Diámetro de la colonia. Diámetros en un intervalo de confianza del 95%.



Control



M7C3



CH2

Figura 10. Zonas de hidrólisis producidas por microorganismo celulolítico.

La cepa M7C3, identificada molecularmente, corresponde a un aislado de *Streptomyces badius*, el cual es una bacteria reportada previamente como productora de enzimas degradadoras de celulosa o lignocelulosa (Phelan y col., 1979); así mismo, otras bacterias de este mismo género han sido reportadas con esta capacidad celulolítica, entre las que se encuentran: *Streptomyces argenteolus* (Ventorino y col., 2016); *Streptomyces griseorubens* (Prasad y col., 2013); *Streptomyces lividans* (Kluepfel y col., 1986) y *Streptomyces viridosporus* (Pometto y Crawford, 1986).

En los hongos, la zona de crecimiento periférico es la región donde las hifas pueden contribuir a la extensión apical de las hifas principales de la colonia. Ésta es una característica del crecimiento fúngico que nos permite realizar cinéticas de crecimiento en medio sólido midiendo el

crecimiento radial y comparar cómo la presencia de metales en el medio de cultivo afecta primero el crecimiento de *Cladosporium cladosporioides* cepa CH2 y su actividad celulolítica (figura 10; tabla 2).

Tabla 2. Relación entre el diámetro de hidrólisis y el diámetro de colonia en la cepa CH2, en presencia y ausencia de diferentes metales.

Parámetro	Control	Zn	Cu	Pb	Mn
Diámetro colonial (cm)	4.5	5	3.2	4.4	4.5
Diámetro de hidrólisis (cm)	5.3	5.7	4	5.4	5.5
Índice enzimático	1.18	1.14	1.25	1.23	1.22
Degradación biomasa					
Desviación estándar	0.047	0.061	0.045	0.07	0.05

3.4. Cinéticas de crecimiento en medio con CMC 1%

La figura 11 corresponde a las proteínas del sobrenadante producidas por la cepa M7C3 en medio mínimo líquido con CMC 1%, en donde se puede observar que en el sobrenadante de este medio de cultivo se detectan proteínas con un máximo a los 9 días. Esta expresión diferencial de proteínas estaría relacionada con las enzimas que requiere la bacteria para la degradación de celulosa.

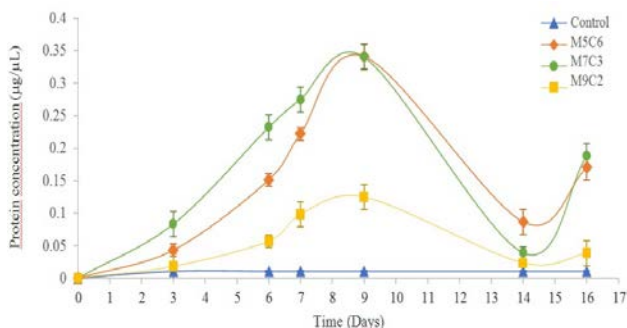


Figura 11. Concentración de proteína extracelular cepa M7C3 cultivada en CMC al 1%.

El cultivo de la cepa fúngica CH2 en medio mínimo líquido con 1% de CMC en presencia de diferentes metales permitió identificar que la presencia de Cu potenciaba la producción de proteína extracelular, lo que implicaría una mayor actividad enzimática inducida por este ion (figura 12).

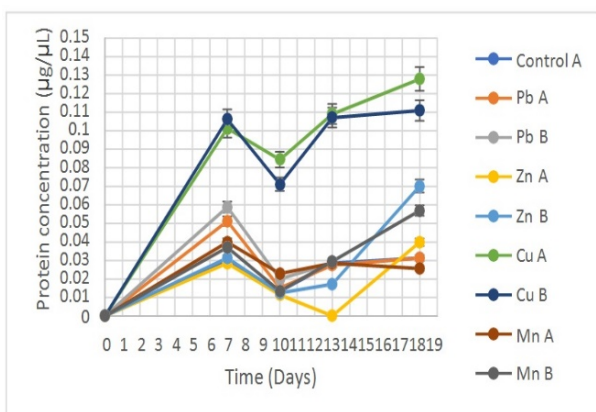


Figura 12. Concentración de proteína extracelular cepa CH2 cultivada en CMC al 1% en presencia y ausencia de diferentes metales.

La figura 13 muestra que el Pb es el metal que más inhibe el crecimiento del hongo

CH2, mientras que para el resto de los metales (Zn, Cu y Mn) permite una cinética de crecimiento similar al control. La tolerancia a los metales en los hongos se puede atribuir a dos características, una es la pared celular, que contiene varios grupos funcionales que absorben metales pesados, y la otra es la capacidad de secretar proteínas o metabolitos quelantes.

La actividad enzimática encontrada en la cepa CH2 concuerda con las características reportadas para *Cladosporium cladosporioides* la cual secreta diferentes enzimas: lacasas, lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, celulasas y hemicelulasas (Ji y col., 2014).

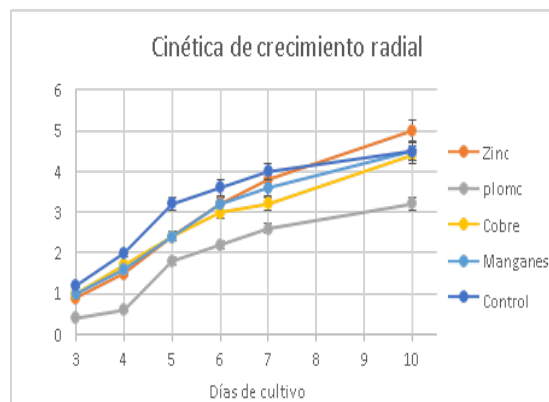


Figura 13. Crecimiento radial de la cepa CH2 cultivada en CMC al 1% en presencia y ausencia de diferentes metales.

4. CONCLUSIONES

En este trabajo se reportan avances sobre la capacidad celulolítica que presentan cepas de hongos y bacterias aislados de



jales mineros de Guanajuato, Gto. Se analizó también el efecto de diferentes metales pesados sobre su crecimiento en CMC 1%. Se propone que estas cepas sean utilizadas posteriormente para purificar los extractos celulolíticos y emplearlos en la sacarificación de residuos agroindustriales (maíz, trigo y sorgo), para finalmente llegar a una etapa de fermentación empleando una cepa de referencia de *S. cerevisiae*.

5. AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional, por el apoyo otorgado al Proyecto de Investigación SIP 20220926, así como a Manuel Antonio Naranjo Reyes, por el apoyo técnico.

6. REFERENCIAS

Baeyens, J., Kang, Q., Appels, L., Dewil, R., Lv, Y. & Tan, T. (2015). Challenges and Opportunities in Improving the Production of Bioethanol. *Progress in Energy and Combustion Science*, 47: 60–88.

Bajpai, P. (2013). Advances in Bioethanol. *Springer*.

Chen, H. & Fu, X. (2016). Industrial Technologies for Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 57: 468–78.

Deng J. X., Paul N. C., Sang H. K., Lee J. H., Hwang Y. S. & Yu S. H. (2012). First Report on Isolation of *Penicillium adametzioides* and *Purpureocillium lilacinum* from Decayed Fruit of

Cheongsoo Grapes in Korea. *Mycobiology*. 40 (1): 66-70.

El-Sersy, N. A., Abd-Elnaby, H. M., Abou-Elela, G. M., Ibrahim, H. A. H., & El-Toukhy, N. M. K. (2012). Optimization, economization, and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*. *African Journal of Biotechnology*, 38(9), 6355-6364.

Gaurav, N., Sivasankari, S., Kiran, G. S., Ninawe, A. & Selvin, J. (2017). Utilization of Bioresources for Sustainable Biofuels: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 73: 205–14.

Gupta, A. & Prakash, J. (2015). Sustainable Bio-Ethanol Production from Agro-Residues: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41: 550–67.

Ji L., Yang J., Fan H., Yang Y., Li B., Yu X., Zhu N. & Yuan H. (2014). Synergy of crude enzyme cocktail from cold-adapted *Cladosporium cladosporioides* Ch2-2 with commercial xylanase achieving high sugars yield at low cost. *Biotechnology for Biofuels*, 7:130.

Kiss, A. A., Radu M. I. & Costin S. B. (2014). Optimal Extractive Distillation Process for Bioethanol Dehydration. *Computer Aided Chemical Engineering*, 33. Elsevier.

Kluepfel, D., Shareck, F., Mondou, F., & Morosoli, R. (1986). Characterization of cellulase and xylanase activities of



Streptomyces lividans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 230–234.

Phelan, M. B., Crawford, D. L. & Pometto III, A. L. (1979). Isolation of lignocellulose-decomposing actinomycetes and degradation of specifically 14 C-labeled lignocelluloses by six selected *Streptomyces* strains. *Canadian Journal of Microbiology*, 25(11), 1270–1276.

Pometto, A. L. & Crawford, D. L. (1986). Effects of pH on Lignin and Cellulose Degradation by *Streptomyces viridosporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(2), 246–250.

Potón J., Moragues M., Gené J., Guarro J. & Quindós G. (2002.) Hongos y actinomicetos alergénicos. Primera edición. *Revista Iberoamericana de Micología*. p. 30.

Prasad, P., Singh, T., & Bedi, S. (2013). Characterization of the cellulolytic enzyme produced by *Streptomyces griseorubens* (Accession No. AB184139) isolated from Indian soil. *Journal of King Saud University - Science*, 25(3), 245–250.

Rodionova, M. V., Poudyal, R. S., Tiwari, I., Voloshin, R. A., Zharmukhamedov, S. K., Nam, H. G., Zayadan, B. K., Bruce, B. D., Hou, J.M. & Allakhverdiev S. I. (2017). Biofuel Production: Challenges and Opportunities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(12): 8450–61.

Samson R.A., Hadlok R., Stolk A.C. (1977). A taxonomic study of the *Penicillium crysogenum* series. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 43: 169-175.

Teather, R. 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.

Torres, D., Rojas-Martínez, R., Zavaleta-Mejía, E., & Guevara, P., Marquez-Guzman, J. & Pérez, C. (2017). *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn., the causal agent of *chrysanthemum white rust*. *PLOS ONE*, 12.

Vargas-Hernández, J. G., Rodolfo, E. & Espinosa, A. (2016). Solar Panel and Renewable Energy in Mexico Development and Outlook for Photovoltaic.

Ventorino, V., Ionata, E., Birolo, L., Montella, S., Marcolongo, L., de Chiaro, A., Espresso, F., Faraco, V., & Pepe, O. (2016). Lignocellulose-adapted endocellulase producing *Streptomyces* strains for bioconversion of cellulose-based materials. *Frontiers in Microbiology*, 7(DEC).

Vohra, M., Jagdish, M., Rahul, M., Satish, P. & Sanjay, P. (2014). Bioethanol Production: Feedstock and Current



Technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1): 573–84.

Wood, T. M. & Bhat, K. M. (1988). Methods for measuring cellulase activities. *Methods in Enzymology*, 160(C), 87–112.

Zamudio, J. (2018). *Diseño de un sistema de control para el proceso de purificación de bioetanol*. Tesis de Maestría. Universidad de Guanajuato.