



REVISTA DE LA ACADEMIA
COLOMBIANA DE CIENCIAS
EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

www.raccefyn.co

Información suplementaria

Evaluación de residuos orgánicos generados en plazas de
mercado para la producción de enzimas bacterianas

Evaluation of organic waste generated in marketplaces to produce bacterial enzymes

Etna Milena Sánchez-Castelblanco, Juan Pablo Heredia- Martín

Etna Milena Sánchez-Castelblanco esanchezc@sena.edu.co

Contenido

Metodología

Caracterización fisicoquímica de los residuos

Caracterización microbiológica de los residuos

Metodología

Caracterización fisicoquímica de los residuos

La caracterización fisicoquímica se realizó por triplicado para cada uno de los seis tipos de residuos clasificados y pretratados (R1 a R6).

Determinación de humedad

Aproximadamente 20 g de residuos sin pretratar se colocaron en cápsulas previamente taradas, se secaron en horno Binder FED 115 por 12 horas a 90 °C hasta peso constante y por diferencia de pesos se calculó el porcentaje de humedad.

Determinación de nitrógeno y proteínas

Para la determinación de nitrógeno se maceraron los residuos pretratados, se pesaron 1,5 g y se realizó una digestión ácida con 12,5 mL de H₂SO₄ al 98 % utilizando K₂SO₄/CuSO₄ como catalizador en un digestor Foss tecator DT 508 a 400 °C durante 2 horas. Como blanco de reactivos se realizaron dos digestiones con glucosa bajo las condiciones descritas anteriormente. Posteriormente, a temperatura ambiente, se realizó una destilación en un equipo Kjeltex 8200. El amoníaco se recuperó por alcalinización sobre una solución concentrada de ácido bórico con indicador Tashiro y el nitrógeno amoniacal se cuantificó por volumetría ácido-base usando HCl 0,15 M estandarizado. El porcentaje de proteínas se calculó multiplicando el contenido de nitrógeno total por el factor 6,25 de acuerdo con Gavidia-Valencia et al. (2020).

Determinación de Carbono Orgánico Total (COT)

El COT se determinó mediante un método de adición estándar modificando la técnica de **Walkley – Black** (1934). En seis tubos se adicionaron 0,1 g de los residuos pretratados y macerados y a cada uno se le adicionó una cantidad creciente de estándar entre 0,0137 y 0,1370 g de glucosa. A cada tubo se le agregaron 5,0 mL de una solución de $K_2Cr_2O_7$ (Merck) al 10% más 5,0 mL de H_2SO_4 concentrado, se dejaron reaccionar por 30 minutos, se adicionó 15 mL de agua destilada, se homogenizó y las mezclas se dejaron a temperatura ambiente toda la noche. Para el blanco se realizó la misma reacción descrita anteriormente sin utilizar residuos. La absorbancia de las muestras se leyó a 600 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV – 1800.

Determinación de azúcares reductores (AR)

5 gramos de residuos pretratados se licuaron con 50 mL de agua destilada, la mezcla se calentó a 60 °C en agitación por 10 minutos, se dejó enfriar, se aforó a 200 mL y se centrifugó por 15 minutos a 4500 rpm en una centrifuga Hettich – Rotanta 460R. En un tubo se tomaron 500 μ L del sobrenadante, 1,5 mL de agua destilada y 500 μ L de ácido 3,5 dinitroacetilsalicílico (DNS) y se dejaron en baño de agua hasta ebullición. Para el blanco se realizó el mismo procedimiento tomando 2 mL de agua destilada y 500 μ L de DNS. La absorbancia de las muestras se leyó a 540 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV – 1800 y utilizando una curva de calibración con patrones de glucosa de 0,08 a 0,58 mg/mL se calculó la concentración de AR (**Olanbiwoninu & Fasiku, 2015**).

Determinación de grasas y aceites (GyA)

Dependiendo el tipo de residuos se pesaron entre 15 a 25 g de R1 a R6 y se realizó una extracción Soxhlet (**Subramanian, et al.**, 2016) en una mezcla de etanol – hexano (1:1) durante 3 horas aproximadamente hasta el agotamiento del material vegetal. Mediante destilación del extracto obtenido se recuperaron las GyA presentes en los residuos y su porcentaje se calculó por diferencia de pesos.

La biomasa residual obtenida del proceso de extracción se deshidrató a 90°C en horno Binder FED 115 entre 16 a 18 horas para la determinación del contenido almidón.

Determinación de almidón

Se tomaron 10 g de los residuos deshidratados luego del proceso de extracción de GyA, se mezclaron con 100 mL de una solución de cloruro de calcio ácida y se llevaron a autoclave por 10 minutos a 120°C y 15 psi. Una vez la solución estuvo a temperatura ambiente se realizó la extracción del almidón según **Englyst, et al.**, (2006) adicionando 10 mL de una solución de acetato de zinc (acetato de zinc Merck 21,9 % p/v y ácido acético Merck 3 % v/v), 10 mL de una solución de ferrocianuro de potasio al 10,5 % p/v y agua destilada hasta un volumen final de 400 mL. Esta mezcla se dejó en agitación entre 250 a 500 rpm (Mezcla A), después de 15 minutos se tomó una muestra de 10 mL, se le adicionaron 0,5 mL de Lugol, se leyó su absorbancia a 650 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV – 1800 y los resultados obtenidos se interpolaron con una curva patrón de almidón con concentraciones entre 0,01 y 0,2 mg/mL (**Ortiz Sánchez, et al.**, 2015).

Determinación de pectina

La Mezcla A resultante de la extracción de almidón se centrifugó por 10 minutos a 2500 rpm en una centrifuga Hettich – Rotanta 460R, el precipitado obtenido se reservó para determinar hemicelulosa y el sobrenadante se filtró al vacío, se le ajustó el pH entre 3 y 4 con ácido clorhídrico 1M, se le adicionó etanol al 96% en proporción 1:1, se dejó a 4 °C por 4 horas para permitir la gelificación y posterior recuperación de las pectinas mediante centrifugación a 2500 rpm por 10 minutos en una centrifuga Hettich – Rotanta 460R. El precipitado obtenido se deshidrató en horno Binder FED 115 a 40 °C por 16 a 18 horas hasta peso constante para cuantificar gravimétricamente la pectina.

Determinación de hemicelulosa

El precipitado obtenido de la centrifugación de la Mezcla A se lavó con agua desionizada hasta retirar el exceso de almidón, lo que fue verificado por la adición de Lugol al agua resultante del lavado. El precipitado libre de almidón se deshidrató en horno Binder FED 115 a 103 °C por 16 a 18 horas hasta peso constante (peso inicial). Para hidrolizar la hemicelulosa se realizó una digestión por 2 horas con una mezcla 10:1 de ácido acético concentrado y ácido nítrico, luego se neutralizó a temperatura ambiente adicionando lentamente y en agitación hidróxido de sodio en escamas. Posteriormente mediante centrifugación a 4600 rpm por 20 minutos en una centrifuga Hettich – Rotanta 460R se recuperó el precipitado compuesto de fibras vegetales y el sobrenadante fue filtrado al vacío para recuperar la totalidad de estas. Las fibras se secaron en horno Binder FED 115 a 90 °C por 8 horas y a 103 °C por 1 hora adicional para su deshidratación completa. Finalmente, las fibras vegetales deshidratadas se pesaron y la cuantificación

gravimétrica de la hemicelulosa se obtuvo por diferencia entre el peso inicial y el peso final.

Determinación de lignina y celulosa

Para cuantificar la lignina presente en las fibras vegetales deshidratadas obtenidas del proceso anterior, se realizó una digestión con hidróxido de sodio al 17,5 %p/v por 2 horas y se neutralizaron a temperatura ambiente adicionando lentamente y en agitación HCl concentrado. La recuperación de la biomasa residual se realizó mediante centrifugación a 4600 rpm por 20 minutos en una centrifuga Hettich – Rotanta 460R, seguida de una filtraron al vacío. La biomasa se deshidrató en horno a 90 °C por 8 horas y a 103 °C por 1 hora, luego se tomó el peso seco final para cuantificar la celulosa. El contenido de lignina se obtuvo de la diferencia entre el peso inicial de las fibras vegetales deshidratadas y el peso determinado para la celulosa (Kulic & Radojčić, 2011).

Caracterización microbiológica de los residuos

Elaboración de medios de cultivo

Para el recuento de bacterias totales se utilizó agar Plate Count (PC) marca Merck®. Para el aislamiento de microorganismos amilolíticos se preparó agar almidón al 1% (AA): almidón 10 g/L, extracto de levadura 2,5 g/L, peptona 2,5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,025 g/L, K_2HPO_4 0,1 g/L, KH_2PO_4 0,1 g/L. Para la siembra de celulolíticos se preparó agar carboximetilcelulosa (CMC): carboximetilcelulosa 10 g/L, extracto de levadura 2,5 g/L, peptona 2,5 g/L, CaSO_4 0,5 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,025 g/L, K_2HPO_4 0,1 g/L, KH_2PO_4 0,1 g/L. Para aislar microorganismos ligninolíticos se realizó agar salvado de trigo (AS): glucosa 2 g/L, peptona 5 g/L, extracto de levadura 2 g/L, MnSO_4 0,075 g/L,

KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L, salvado de trigo 175 g/L. Se realizó agar Tween 80 (AT) para recuperar los microorganismos lipolíticos: K_2HPO_4 2,5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,3 g/L, urea 1,3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L, extracto de levadura 0,5 g/L, Tween 80 1% v/v, CaCl_2 0,5 g/L. Para aislar microorganismos proteolíticos se preparó agar leche (AL): peptona 5 g/L, extracto de Levadura 2,5 g/L, glucosa 1g/L, leche descremada en polvo 10 g/L. La concentración de agar - agar en todos los medios fue del 1,5 %p/v.

Para la selección de microorganismos ligninolíticos se preparó agar azure B (AZ): Peptona 5 g/L, extracto de levadura 3 g/L, NaCl 8 g/L, azure B (SIGMA®) 0,01 %p/v. Agar ABTS (ABTS): Peptona 5 g/L, extracto de levadura 3 g/L, NaCl 8 g/L, 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina - 6 - ácido sulfónico (SIGMA®) 0,2 mM. Agar lignina alcalina con guayacol (AG): Extracto de levadura 2 g/L, NH_4NO_3 0,1 g/L, KOH 0,2 g/L, KH_2PO_4 0,5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g/L, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g/L, lignina alcalina (TCI®) 1 g/L, guayacol (ACROS ORGANICS®) 1,2 mL/L. La concentración de agar - agar en todos los medios fue del 1,5 %p/v y el pH de los medios fue ajustado a $6,5 \pm 0,2$ con NaOH 1M.

Aislamiento de bacterias

Para el aislamiento de bacterias totales, amilolíticas, celulolíticas, ligninolíticas, lipolíticas y proteolíticas se pesaron 10 g de la muestra compuesta de R1 a R6, se realizaron diluciones en serie y se sembraron las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} en la superficie de PC, AA, CMC, AS, AT y AL respectivamente. Los agares se incubaron a 37 °C, después de 48 horas de incubación se realizó el recuento en cada uno de los agares y se reportaron las Unidades Formadoras de Colonia por gramo de residuo (UFC/g). Las siembras para cada

tipo de microorganismo se realizaron por triplicado y los resultados del recuento obtenido se promediaron.

Selección de microorganismos con actividad enzimática

La selección de microorganismos se realizó a partir de colonias con diferentes características morfológicas obtenidas de los aislamientos bacterianos realizados anteriormente.

Para los microorganismos amilolíticos, celulolíticos, proteolíticos y lipolíticos se realizaron siembras por punción de las colonias seleccionadas en AA, CMC, AL y AT respectivamente y se incubaron a 37°C por 48 horas. Posteriormente, se identificó la presencia del halo de hidrólisis o zona de aclaramiento alrededor de las colonias. Para revelar el halo de hidrólisis del almidón se aplicó una gota de Lugol sobre la colonia, la zona de hidrólisis de la celulosa se registró 12 horas después de la adición de rojo Congo al 1% p/v y NaCl 2M y para evidenciar la zona de hidrólisis en el AL no fue necesaria la adición de reactivos. Posteriormente se calculó el radio de hidrólisis dividiendo el diámetro del halo entre el diámetro de la colonia. Las bacterias con actividad enzimática comprobada (presencia de halo) fueron seleccionadas.

Para la selección de microorganismos lignilolíticos se realizaron siembras por punción de las colonias seleccionadas en AZ, ABTS y AG y se incubaron a 37°C por 5 días, verificando cada 24 horas el crecimiento y la presencia de zonas de aclaramiento. Los microorganismos que crecieron en los tres medios o que presentaron zona de aclaramiento fueron seleccionados.

Los microorganismos seleccionados se aislaron por estría y a partir de estos aislamientos se realizaron cultivos de 24 horas en caldo BHI (Merck®). Estos fueron dispensados en

crioviales adicionando caldo BHI - glicerol al 20 %v/v y llevados a -80°C para su uso potencial en procesos de obtención de enzimas bacterianas.

La caracterización fisicoquímica y microbiológica de los residuos se hizo para cada uno de los 3 muestreos realizados y los datos reportados son el promedio de los resultados obtenidos en cada uno.

Referencias

Englyst, K.N., Hudson, G.J., Englyst, H.N. (2006). Starch Analysis in Food. En R. Meyers. (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory, and Instrumentation* (pp. 4246–4262). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

Gavidia, J.G., Venegas, E.A., Ríos, M., Uribe, J.C., Gutiérrez, D.D., Rengifo, R.A., Martínez, J.L. (2020). Determination of the nitrogen to protein conversion factor in eggs of *Coturnix coturnix* L. (Japanese quail). *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 39, 706–708.

Kulic, G., Radojičić, V. (2011). Analysis of cellulose content in stalks and leaves of large leaf tobacco. *Journal of Agricultural Sciences*, 56, 207-215.

Olanbiwoninu, A. A., Fasiku, S. (2015). Production of bacterial amylases and cellulases using sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) peels. *African Journal of Biochemistry*, 9, 104–109.

Ortiz Sánchez, I.A., Álvarez Reyna, V.d., González Cervantes, G.V., Potisek Talavera, M.d., Chávez Simental, J.A. (2015). Concentración de almidón y proteínas solubles en tubérculos de *Caladium bicolor* en diferentes etapas fenológicas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6, 483-494.

Subramanian, R., Subramaniyan, P., Noorul Ameen, J., Raj, V. (2016). Double bypasses soxhlet apparatus for extraction of piperine from *Piper nigrum*. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, 537-540.

Walkley, A.J., Black, I.A. (1934). Estimation of soil organic carbon by the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37, 29-38.

