



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

## DISEÑO DE UN BIOPROCESO PARA PRODUCCION DE ETANOL A PARTIR DE LODOS PAPELEROS USANDO EXTRACTO ENZIMATICO PRODUCIDO POR HONGOS FILAMENTOSOS (*Verticillium sp.* y *Penicillium sp.*)

I. Angulo<sup>1</sup>; R.E. Prieto<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Facultad de Ingeniería, Universidad de La Sabana. Estudiante de Maestría en Diseño y Gestión de Procesos - Énfasis bioprocesos*

<sup>2</sup> *Facultad de Ingeniería, Universidad de La Sabana. Coordinadora Investigación*

### 1. INTRODUCCIÓN:

Las celulasas están despertando cada vez más interés en aplicaciones dirigidas a la agricultura, biotecnología y usos bioenergéticos (Phitsuwan et al., 2013). Estas proteínas, actualmente son producidas comercialmente, pero en una escala relativamente pequeña (Wang et al., 2010), es así que muchas investigaciones se han centrado en la producción de extractos celulolíticos y en la importancia de mejora de las mismas con el fin de lograr que su costo permita hacer más rentable su uso en biorefinerías (Zhang, Himmel, & Mielenz, 2006).

Paralelamente, la búsqueda de nuevas alternativas para la gestión del lodo papelerero en la industria de producción de papel, ha sido un objetivo agresivamente perseguido por muchas compañías y son especificadas como prioridad en los compromisos de la Agenda 2020 (American Forest & Paper Association, 1994). Diversos autores consideran el lodo papelerero como un subproducto de interés con potencial para la producción de bioetanol, a causa de su composición alta en celulosa y baja en lignina comparada con otros materiales lignocelulósicos (Kang, Wang, & Lee, 2010; Lynd et al., 2001; Mora & Banerjee, 2013; Peng & Chen, 2011; Silva et al., 2011; Wang et al., 2010; Yamashita et al., 2008).

### 2. OBJETIVOS:

- **Objetivo General:** Diseñar un proceso de producción bioetanol a partir de lodos papeleros por técnicas de hidrólisis y fermentación simultánea con extracto enzimático obtenido a partir de hongos filamentosos.



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

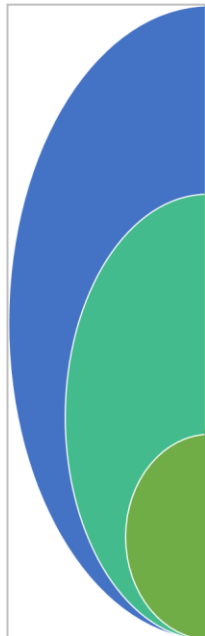
- **Objetivos específicos:**

- Establecer las variables (temperatura, concentración de sólidos y concentración de enzima) del proceso de hidrólisis y fermentación simultánea con el extracto enzimático.
- Establecer la eficiencia del proceso de hidrólisis y fermentación simultáneos para la obtención de bioetanol a partir del lodo papelero con extracto enzimático y enzimas comerciales.
- Comparar la eficiencia de los procesos enzimáticos para determinar la viabilidad técnica del uso del extracto enzimático.

### 3. MÉTODOS:

El proyecto se desarrolló en tres etapas, las metodologías requeridas en cada una de las etapas se describen en la Figura 1, todos los ensayos se efectuaron por triplicado.

**“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”**  
**Multidisciplinario**  
 21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

	<p><b>Etapa 1.</b>  <b>Obtención de extractos enzimáticos</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los hongos filamentosos aislados a partir de residuos agroindustriales y caracterizados por Beltran &amp; Leguizamón (2012) fueron activados en agar carboximetilcelulosa (CMC) 1% a 25°C por 5 días.</li> <li>• La Fermentación en medio sólido a 30°C con papel Whatman N°1 y producción de extracto ultrafiltrado (10 kDa), se desarrolló según metodología de Pulido (2013)</li> <li>• Se estimó la Actividad enzimática total (FPase) por metodología propuesta por Ghose Ghose (1987), determinando azúcares reductores por método DNS (Miller, 1959) con el espectrofotómetro marca Perkin Elmer® Lambda350</li> <li>• La cuantificación de proteínas se efectuó por el método Bradford modificado (Zor &amp; Selinger, 1996) en equipo iMark Microplate – Reader marca Biorad® (R<sup>2</sup>= 0.9968)</li> <li>• Se realizó identificación de proteínas por medio de electroforesis SDS-PAGE.</li> </ul>
	<p><b>Etapa 2.</b>  <b>Hidrólisis del sustrato lignocelulósico</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La caracterización del lodo papero se hizo mediante metodologías Tappi para determinación de celulosa y hemicelulosa (T203), lignina (T236), extractivos (T204), cenizas a 525°C (T211) y cenizas a 900°C (T413)</li> <li>• Se estimó la capacidad buffer del lodo según ensayo propuesto por Li Kang, Wang &amp; Lee 2010</li> <li>• Los ensayos de hidrólisis se efectuaron en matraces de 250 mL con un volumen de trabajo de 100 mL.</li> <li>• Se desarrolló un diseño experimental por bloques de temperatura 3<sup>3</sup>: - Factores: carga de sólidos (5%, 9.09%, 18.17% g lodo base seca/ 100mL medio); temperatura (37, 45, 55 °C); y concentración de enzima (3%, 6% y 9% g enzima/100g celulosa). Control positivo: complejo enzimático comercial Cellic®, cortesía de Novozymes. - Variable de respuesta: Azúcares reductores por método Miller (1959)</li> <li>• Se tomaron muestras cada 12 horas durante 72 horas de proceso, que fueron centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos para la determinación de azúcares reductores con el espectrofotómetro marca Perkin Elmer® UV/Vis Lambda 350, con un coeficiente de correlación de 0.9973 .</li> </ul>
	<p><b>Etapa 3.</b>  <b>Producción de bioetanol</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Según las mejores condiciones identificadas en la etapa 2, se hizo una fermentación por hidrólisis y fermentación simultánea según Protocolos Experimentales para SSF (Dowe &amp; Mcmillan, 2008) con la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> comercial <i>Fermipan</i>®, paralelamente se monta una hidrólisis enzimática como control.</li> <li>• Se tomaron alícuotas de 2 mL cada 24 horas durante 8 días. Se determinaron azúcares reductores por método DNS y etanol por cromatografía de gases utilizando cromatógrafo marca Perkin Elmer modelo Clarus580, con una columna Carbowax (30 m, 0,32 mm y 0,25 µm), detector de ionización de llama (FID) a 250°C, temperatura del inyector 150°C, condiciones de gradiente de temperatura iniciando a 85°C y luego se elevó a una velocidad de 45°C/min hasta 120°C se sostuvo durante 6 min. Se inyectaron 5 µL de cada muestra. Se construyó una curva patrón con Etanol Absoluto (99,9%) en un rango de concentraciones de 0,5 a 6% (%) de etanol y un coeficiente de correlación de 0.9853.</li> </ul>

**Figura 1. Descripción de metodologías empleadas en cada fase del proyecto**

**4. RESULTADOS:**

- La cepa *Verticillium sp.*, produjo 80.7% más extracto que *Penicillium sp.*, (6.75 ±2.78 mg de extracto/ g papel filtro. El contenido de proteína de los extractos concentrados de *Verticillium sp.* y *Penicillium sp.* fueron respectivamente 3.15 (1.76) y 2.87 (1.6) mg/mL de extracto, equivalente a 0.15 (0.04) y 0.22 (0.16) mg de proteína / mg de extracto liofilizado.
- Se identificaron 7 proteínas con pesos moleculares en el rango 12.56 (1.5) a 102.27 (2.3) kDa para el extracto de *Verticillium sp.* Para el extracto de *Penicillium sp.* se identificaron 10 proteínas con pesos moleculares entre 11.62 (0.2) y 118.6 (2.0) kDa (ver Figura 2).

“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

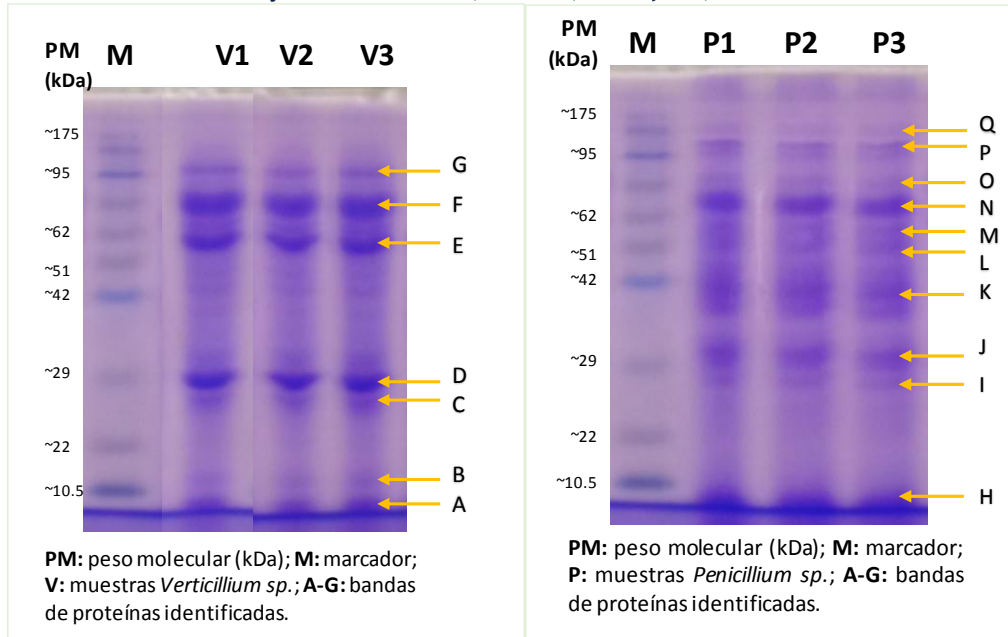
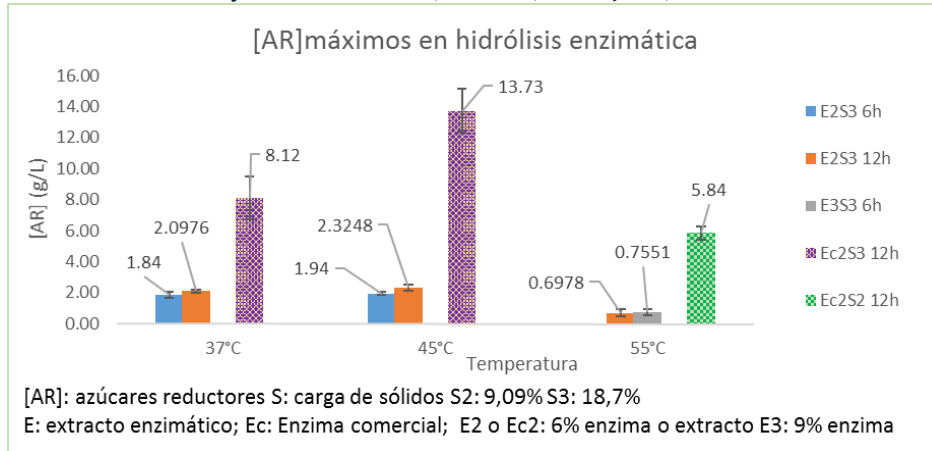


Figura 2. Electroforesis SDS-Page de extractos enzimáticos

- La actividad total para el extracto de *Verticillium sp.* fue 0.054 ( $\pm 0.022$ ) FPU/mL, equivalente a una actividad específica de 0.54 ( $\pm 0.2$ ) FPU/g extracto y para *Penicillium sp.* de 0.131 ( $\pm 0.035$ ) FPU/mL, y una actividad específica de 1.31 ( $\pm 0.4$ ) FPU/g extracto.
- La composición principal del lodo papelerero es 59.9% de cenizas a 525°C, 32.82% de contenido de celulosa y 2.94% de lignina. El ensayo de capacidad buffer del lodo permite definir que no se requiere solución buffer para el proceso SSF.
- Bajo las mejores condiciones de hidrólisis identificadas con agitación de 150 rpm (45°C, 6% de enzima comercial o extracto enzimático y 18,17% de sólidos), el extracto enzimático produce el 26% de los AR producidos con el complejo Cellic® a 37°C y el 17% de los producidos a 45°C (ver Figura 3).
- El porcentaje de digestibilidad del lodo en las hidrólisis a 45°C, 200 rpm, 6% de extracto o complejo Cellic y 18,17% de sólidos, fue de 6.7% con el extracto enzimático y 40.6% con el complejo Cellic® en 12 horas de proceso.

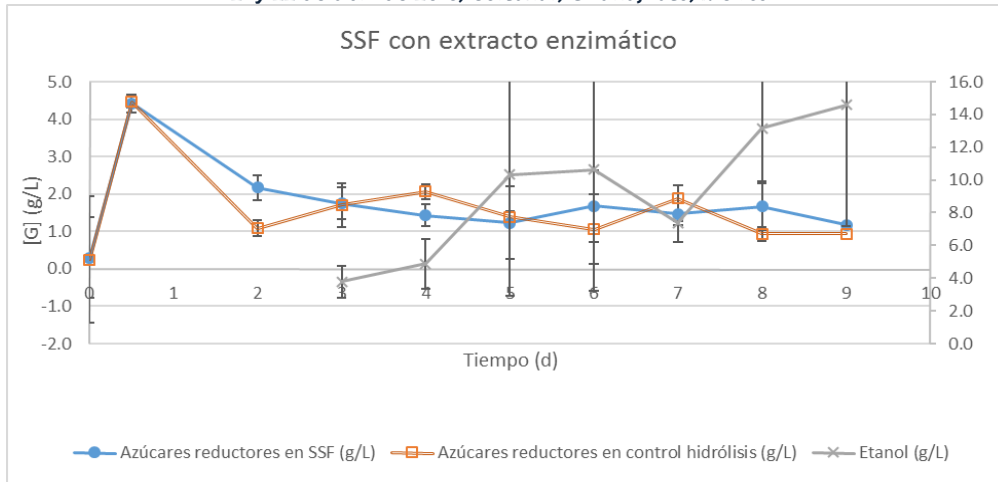
**“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”**  
 Multidisciplinario  
 21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México



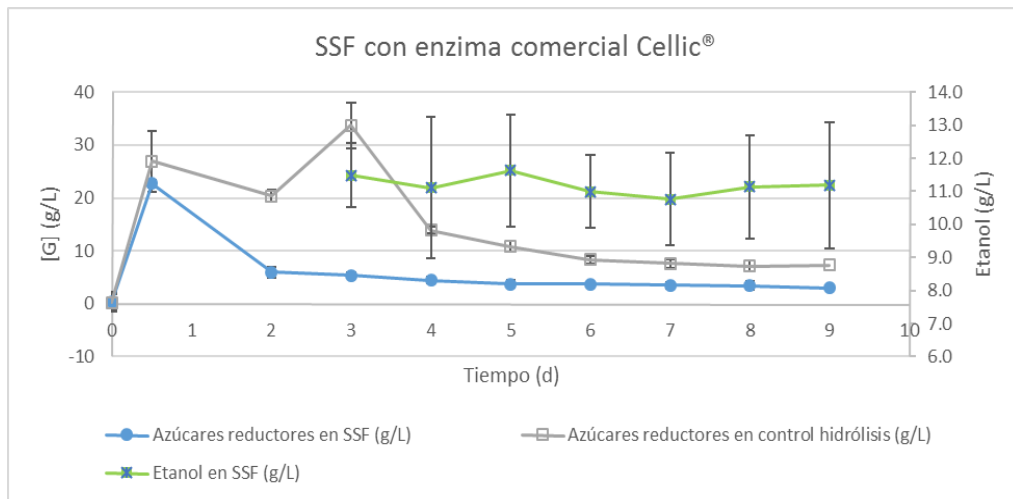
**Figura 3. Máximas concentraciones de azúcares reductores en hidrólisis**

- El proceso SSF con extracto enzimático, alcanza una producción de 4.4 g/L de AR en 12 horas de hidrólisis con 200 rpm y 45°C, lo que representa el 19.5% de lo producido con la enzima Cellic® en las mismas condiciones.
- Figura 4 muestra el proceso SSF con extracto enzimático y la Figura 5 el proceso con complejo enzimático Cellic®. A partir de las 12 horas de hidrólisis (momento de adición del inóculo de levadura), las reducciones observadas de los AR coinciden con los incrementos de etanol registrados.
- En la SSF con extracto enzimático se producen 1.85 g/L como máxima producción de etanol al día 9, mientras que con el complejo enzimático Cellic® se obtienen 1.47 en el día 5 de proceso.
- El rendimiento teórico de etanol con respecto al contenido de hexosas en 9 días (g etanol / g glucosa) fue de 43.12% para la SSF con extracto enzimático y 33.03% con complejo Cellic®.

**“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”**  
 Multidisciplinario  
 21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México



**Figura 4. SSF con extracto enzimático**



**Figura 5. SSF con complejo enzimático Cellic®**

**5. CONCLUSIONES:**

- Los parámetros cinéticos evaluados demuestran un mejor comportamiento del extracto enzimático en el proceso SSF, teniendo el complejo Cellic® una mayor actividad enzimática.
- Los mejores resultados de la producción de etanol en un proceso SSF, se obtuvieron con el extracto enzimático y lodo papelerero como fuente lignocelulósica, en matraces





## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

agitados en comparación con los obtenidos con la enzima Cellic® en 9 días de proceso. Estos resultados muestran el potencial del extracto enzimático utilizado como degradante de compuestos lignocelulósicos en el proceso SSF para la producción de etanol de segunda generación.

- Los resultados del extracto enzimático son prometedores para aplicaciones de hidrólisis enzimáticas y fermentaciones, considerando que las proteínas son extractos crudos que no han sido sometidos a purificación.
- El lodo papелero presenta capacidad buffer por el contenido de cenizas, esta propiedad puede favorecer el control de pH en procesos fermentativos dado el efecto de los subproductos generados durante la producción de bioetanol.
- Se identifican 7 posibles celulasas para el extracto de *Verticillium* sp. y 10 para *Penicillium* sp., el número de proteínas mencionadas, es coherente con los resultados de actividad total de celulasas siendo superior el del extracto de *Penicillium* sp.