

D 14. RENDIMIENTO EN LA SACARIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE MADERA DE *Eucalyptus globulus* Labill, PRETRATADA CON HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA CON MIRAS A LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL.

René Carmona Cerda. Ingeniero Forestal, Doctor en Ciencia Forestal ©, Profesor Asistente.

Chile, Santa Rosa 11315, Santiago. Casilla 9206. Departamento de Ingeniería de la Madera. Facultad de Ciencias Forestales Universidad de Chile recarmon@uchile.cl

Ricardo Silva S. Profesor Asistente

Chile, Santa Rosa 11315, Santiago. Casilla 9206. Departamento de Ingeniería de la Madera. Facultad de Ciencias Forestales Universidad de Chile

Carolina Vicuña V. Licenciada en Ingeniería Forestal.

Chile, Santa Rosa 11315, Santiago. Casilla 9206. Departamento de Ingeniería de la Madera. Facultad de Ciencias Forestales Universidad de Chile

Felipe Villaseñor. Licenciado en Ingeniería Forestal

Chile, Santa Rosa 11315, Santiago. Casilla 9206. Departamento de Ingeniería de la Madera. Facultad de Ciencias Forestales Universidad de Chile

M^a Elena Lienqueo. Profesor Asociado

Chile, Beauchef 861 Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas Universidad de Chile

Oriana Salazar. Profesora Asistente

Chile, Beauchef 861 Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas Universidad de Chile

Palabras claves: Bioetanol, biocombustibles, sacarificación enzimática, pudrición blanca, Eucaliptus

RESUMEN

En el desarrollo de tecnologías para la obtención de energía de recursos naturales renovables más económicas y amigables con el ambiente, los materiales lignocelulósicos como la madera son una fuente interesante. La obtención de etanol a partir de ellos está limitada, entre otras cosas, por la presencia de lignina, que constituye una barrera en la sacarificación enzimática. Este trabajo estudia el efecto de pretratar madera de *Eucalyptus globulus*, con cinco cepas de hongos de pudrición blanca (HPB) y tres tiempos de acción, sobre el rendimiento de azúcares fermentables. Astillas finas de esta especie fueron inoculadas separadamente con los HPB y mantenidas en cámara de incubación por 30, 45 y 60 días. Adicionalmente, se incluyó como testigo madera sin pretratar. Finalizado el pretratamiento biológico, se determinó la pérdida de peso producida por la acción fúngica. La hidrólisis enzimática se realizó en un reactor discontinuo a temperatura constante de 37 °C. Se emplearon enzimas celulasas, manteniendo constante la relación sólido/líquido en 1/10 (p/v) y una velocidad de agitación de 150 rpm., relación enzima / sustrato en 0,004 g/g. Finalmente, se determinó la cantidad de azúcares obtenidos. Los resultados preliminares indican que la reducción

de peso promedio se correlacionó con el tiempo de incubación con los HPB. Los valores más altos para cada uno de los tiempos probados se registran con *Stereum sp.* y *Lentinus sp.*, con 27,2 y 25,8 % a los 60 días respectivamente. Las menores pérdidas de peso se obtuvieron con *Coriolus sp.* y *Pleurotus sp.*, con un 6,0 y 9,1 % a los 60 días.

INTRODUCCIÓN

La celulosa, el componente mayoritario de materiales lignocelulósicos tales como la madera y los residuos agrícolas, constituye una de las fuentes renovables de polisacáridos más abundantes con que cuenta el ser humano. Puede ser aprovechada por medio de su conversión a etanol, lo que implica una hidrólisis de la misma a los azúcares constituyentes, pudiendo realizarse esta sacarificación por medio de ácidos o enzimas.

Una de las limitaciones en la hidrólisis enzimática de la celulosa es la presencia de lignina, que constituye una barrera física para la penetración de las enzimas celulolíticas. Además, la cristalinidad de las moléculas de celulosa dificulta aún más la acción de las enzimas, requiriéndose una modificación de su estructura mediante un pretratamiento que permita aumentar los rendimientos de azúcares fermentables (Romano, *et al.*, 2005)., los cuales pueden ser posteriormente convertidos en etanol mediante microorganismos, proceso conocido como fermentación, que puede utilizar uno o varios de los azúcares presentes en el material lignocelulósico pretratado e hidrolizado. Este proceso y las etapas posteriores de destilación, son bastante conocidas y de aplicación industrial con azúcares provenientes de la caña de azúcar y la remolacha, así como de otras fuentes de azúcares por ejemplo almidones de maíz y otros granos (Oliva, 2003).

El pretratamiento biológico de sustratos lignocelulósicos utilizando Hongos de Pudrición Blanca (HPB) ha sido utilizado en paja de arroz (Taniguchi *et al.*, 2005), paja de trigo (Hatakka, 1983) y madera de latifoliadas (Sun y Cheng, 2001; Ballesteros, 1999). Dado que este tipo de microorganismos son capaces de desarrollarse utilizando preferentemente la lignina como fuente de energía; su inclusión como tratamiento inicial del complejo lignocelulósico permitiría evitar reducciones significativas en el rendimiento en azúcares en las etapas posteriores para la obtención de etanol. (Fengel y Wegener, 1984; Blanchette *et al.*, 1985; Jarpa, 1988). El empleo de este tratamiento biológico implica bajos requerimientos de energía, condiciones de reacción suaves, aumento en la actividad de las celulasas y en el rendimiento de la hidrólisis de la celulosa, además de menos reacciones colaterales (Sun y Cheng, 2001; Hamelink *et al.* 2003; Romano *et al.*, 2005). Además, la alteración provocada al complejo lignocelulósico por los HPB reduce la energía necesaria para el astillado (molienda) y mejora el acceso de productos químicos al mismo, reduciendo los tiempos de tratamiento (Tapia *et al.*, 2000).

La utilización de los residuos forestales, derivados de las operaciones de manejo y cosecha en el bosque y de la transformación mecánica de la madera en aserraderos, permitiría un sustancial incremento de la capacidad de producción de etanol combustible y una reducción del costo de producción, debido a los bajos costos de la materia prima. Junto con ello, cabe destacar el hecho de que el bioetanol producido a partir de biomasa, se ha identificado como una opción altamente efectiva desde el punto

de vista económico, para la reducción de las emisiones de CO₂ en el sector del transporte (Romano *et al*, 2005). Por ejemplo, se ha estimado que el reemplazo de un Litro de gasolina por un Litro de Bioetanol reduciría en un 70% la producción de CO₂. (Oliva, 2003).

En la producción a gran escala de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, la relación entre energía liberada durante la combustión de etanol y la energía necesaria para su producción, considerando todo el ciclo de producción, es 6, desde la extracción de las materias primas y los insumos requeridos, hasta el proceso de transformación a bioetanol (Sánchez y Cardona, 2005).

Uno de los principales desafíos en la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica es el pretratamiento e hidrólisis de la materia prima, aspecto que fue abordado en este estudio y cuyo objetivo general fue determinar el rendimiento en azúcares reductores en la sacarificación enzimática de madera sometida a pretratamiento biológico con Hongos de Pudrición Blanca, con miras a la obtención de etanol.

MATERIALES Y METODO

MATERIALES

El material lignocelulósico empleado en el estudio consistió en madera de *Eucalyptus globulus* Labill procedente de una Planta de Astillado. Este subproducto del proceso de astillado corresponde a partículas de madera con dimensiones aproximadas de 1mm de espesor, 1 a 3 mm de ancho y 5 mm de largo.

Los hongos utilizados fueron obtenidos del Laboratorio de Biodeterioro y Preservación del Departamento de Ingeniería de la Madera, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile. Estos hongos corresponden a *Coriolus spp.* (168-H), *Peniophora spp.*(127-G) *Lentinus spp.* (156-E), *Stereum spp.* (168-H), *Pleurotus spp.*(190-O); todos de pudrición blanca.

Para la sacarificación enzimática se utilizó una celulasas comercial: Cellulase (EC 3.2.1.4) de SIGMA, obtenida del hongo *Trichoderma viride* (C 1794).

METODO

Tratamiento con Hongos de Pudrición Blanca (HPB)

Los niveles de las variables en estudio, Especie de hongo y Tiempo de acción sobre la madera, correspondieron a cinco hongos y tres tiempos de exposición: 30, 45 y 60 días. De la combinación de los distintos niveles de las variables indicadas surgen 15 tratamientos, más un tratamiento control consistente de madera sin pretratar con hongos, realizándose tres repeticiones para cada uno de ellos.

Tratamiento Enzimático

Para el tratamiento enzimático de los pin-chips, atacados previamente por los hongos y en los tiempos ya indicados, se utilizó una celulasa comercial (EC 3.2.1.4). Se aplicaron 4,0 mg de enzima por gramo de pin-chips seco, equivalente a una dosis de 38 unidades de enzima por gramo de pin-chips. La enzima comercial en polvo fue disuelta en tampón citrato-fosfato (ácido cítrico 0,1M; fosfato disódico 0,2M) a pH 5,0. La concentración de la disolución enzima-tampón fue de 0,04% (p/v). El tratamiento de los pin-chips se realizó como sigue. Primeramente se tomaron 3 g. de pin-chips de cada una de las tres repeticiones, provenientes de cada pretratamiento hongo-tiempo, incluidos los testigos, los que fueron mezclados y molidos en un molino Wiley a una granulometría que pasa las 20 mallas. Luego, de estos 9 g de pin-chips molidos se tomaron tres muestras, de 1 g cada una, las que fueron puestas en tubos de ensayo independientes. A continuación se adicionó a cada tubo de ensayo 10 ml de la disolución enzima-tampón, correspondiente a la dosis de enzima prefijada. Finalmente, los tubos de ensayo fueron tapados y llevados a un agitador orbital, a 37 °C y 150 rpm por, un tiempo de 38 horas. Adicionalmente, se midieron los azúcares reductores en la mezcla de tratamiento (tampón-enzima) y los obtenidos en madera sin pretratar con HPB sometida al tratamiento enzimático

Los azúcares reductores se midieron mediante reducción de ácido dinitrosalicílico (Bailey, 1981) (ADNS). Se usó un método adaptado al formato de microplacas de 96 pocillos (Salazar O. *et a*, 2006). 50 µL de una dilución de la muestra proveniente de la mezcla de tratamiento, previamente centrifugada, se mezclaron con 50 µL de solución de ADNS (ácido dinitrosalicílico 1 %, NaOH 0,2 N, sal de Rochelle 30%) en placas de 96 pocillos termoresistentes. Las placas se incubaron a 100 °C por 10 min y posteriormente se transfirieron a hielo por 5 min. Una alícuota de 50 µL se usó para medir absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro lector de placas Anthos modelo 2010. Para transformar estos valores en concentración de glucosa, los valores de absorbancia se interpolaron en una curva de calibración con glucosa, cuya linealidad se mantuvo entre 0.5 y 8.5 mM de glucosa.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Pérdida de peso.

En el cuadro N° 1, se muestran los valores de pérdida de peso obtenidos en cada uno de los tratamientos evaluados.

Cuadro N° 1. Pérdida de peso promedio obtenidas en el Pretratamiento con HPB.

	PERDIDA DE PESO PROMEDIO (%)		
	TIEMPOS DE ACCIÓN (DÍAS)		
HONGO	30	45	60
<i>Stereum spp.</i> (168-H)	15,8	21,7	27,2
<i>Lentinus spp.</i> (156-E)	11,1	20,1	25,8
<i>Peniophora spp.</i> (127-G)	9,2	15,7	20,0
<i>Coriolus spp.</i> (162-V)	2,6	5,3	6,0
<i>Pleurotus spp</i> (190-O)	5,4	7,4	9,1

Cada valor corresponde al promedio de tres repeticiones.

En general, se obtuvo una mayor pérdida de peso al aumentar el tiempo de acción de los distintos hongos sobre el sustrato leñoso. No obstante, existe variación entre las determinaciones individuales correspondientes a cada repetición. Los valores más altos se obtuvieron con los hongos 168-H y 156-E con máximos de 27,2 y 25,8 % a los 60 días, y mínimos de 15,8 y 11,1 % a los 30 días, respectivamente. Los hongos menos agresivos correspondieron a 162-V y 190-O, con pérdidas de peso máximas a los 60 días de 6,0 y 9,1 %, y mínimas de 2,6 y 5,4 %, a los 30 días, respectivamente.

Rendimiento de azúcares reductores

De los cinco hongos probados en el pretratamiento de la madera, fueron seleccionados tres, 168-H; 127-G y 190-O para medir el efecto sobre el rendimiento de azúcares reductores, expresados como milimoles de azúcares reductores. Los resultados medidos después de la hidrólisis enzimática se muestran en el cuadro siguiente (N° 2).

Cuadro N° 2. Rendimiento en azúcares reductores obtenidos para los tres HPB y tiempos evaluados.

RENDIMIENTO DE AZÚCARES REDUCTORES			
(mM)			
HONGOS			
TIEMPO (DÍAS)	168-H	127-G	190-O
30	20,84	13,91	15,62
45	37,22	30,98	10,27
60	39,79	28,25	14,23

Cada valor corresponde al promedio de dos determinaciones en cada una de las tres repeticiones por tratamiento enzimático.

La medición de los azúcares reductores en la mezcla de tratamiento (tampón-enzima) dio un valor de 0,96 mM, mientras que en la madera sin pretratar con HPB (Testigo) esta fue de 6,45 mM.

Al comparar el valor de azúcares reductores obtenido en el tratamiento testigo con todos los tratamientos en que se emplearon HPB previamente, existe un significativo aumento en el rendimiento de éstos. La madera pretratada muestra un alza que oscila entre 1,59 y 6,17 veces la cantidad de azúcares reductores que se obtuvieron en el testigo. El hongo más eficiente fue 168-H con 3,23; 5,77 y 6,17 veces la cantidad de azúcares del testigo, a los 30, 45 y 60 días de tratamiento fúngico. Le sigue el hongo 127-G, con 2,16; 4,80 y 4,38 veces a los 30, 45 y 60 días, respectivamente. Estos valores disminuyen ligeramente si se resta el valor de 0,96 mM que arrojó la solución con la enzima empleada en el tratamiento de sacarificación.

El rendimiento en azúcares reductores muestra un aumento con la duración del tratamiento con los HPB, observándose un fuerte incremento entre los 30 y 45 días, para 168-H y 127-G. El hongo 190-O muestra los valores más bajos, los que no aumentan con el tiempo de tratamiento.

Por otra parte, los valores de obtenidos en azúcares reductores se muestran directamente relacionados con los valores de pérdida de peso (Ver cuadro N°1), para los hongos 168-H y 127-G, coincidiendo el aumento en la pérdida de peso con aumentos en el rendimiento de azúcares para los 30 y 45 días. Se verifica además, un menor aumento en el rendimiento de azúcares con relación a la pérdida de peso a los 60 días. Esto es atribuible a que los HPB, si bien atacan selectivamente la lignina, poseen la capacidad de depolimerizar polisacáridos y consumir los azúcares liberados, dejando las fracciones de celulosa y hemicelulosas más resistentes al ataque enzimático después de un período inicial. La actividad de los complejos enzimáticos propios del hongo durante el pretratamiento, también incidió en la variabilidad de los resultados. No obstante, tal como se observa en el cuadro N°2, existen claras diferencias en el efecto de los tratamientos con los hongos de pudrición blanca.

Los resultados obtenidos avalan la potencialidad del pretratamiento fúngico con miras a la obtención de etanol. No obstante, es necesario complementar la información con análisis del residuo sólido de la sacarificación, y con la presencia y tipo de enzimas en la fracción líquida después del tratamiento de sacarificación.

CONCLUSIONES

- Existe un significativo aumento en el rendimiento de azúcares reductores producto del pretratamiento con HPB.
- El tipo de hongo y el tiempo de acción del mismo son variables que inciden en la pérdida de peso y en el rendimiento de azúcares reductores .
- Existe una relación directa entre la pérdida de peso y el rendimiento de azúcares reductores para los hongos 168-H y 127-G a los tiempos de 30 y 45 días.
- Los mejores tratamientos, considerando el tiempo de acción de los hongos y el rendimiento de azúcares fermentables, corresponden a los obtenidos al aplicar los hongos 168-H y 127-G a los 45 días.

BIBLIOGRAFÍA

BAILEY M., N.H., 1981. Enzyme Microbiol. Technol. , **3**: 153-157.

BALLESTEROS, I. 1999. obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica mediante un proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS). Centro de lectura Universidad de Alcalá, Centro de realización: CIEMAT.

BLANCHETTE, R.A.; L. OJTEN; M.J. EFFLAND AND W.E. ESLYN.1985. Changes in structural and chemical components of wood delignified by fungi. Wood Science and Technology 19:35-46.

BARBA, C. 2002. Síntesis de carboximetilcelulosa (CMC) a partir de pastas de plantas anuales, materiales lignocelulosicos. URV, departament d'enginyeria química. [En línea] <http://www.tdx.cesca.es/tesis_urv/available/tdx-0812102-093854/fundamentos-5.pdf>, [consulta: 8 de septiembre del 2006].

FENGEL, D. Y WEGENER, G. 1984. “ Wood . Chemistry, Ultraestructure, Reactions”. Walter de Gruyter, Berlín. 422 p.

- HAMELINCK, C., HOOIJDONK, G. y FAAIJ, ANDRE. 2003. Prospects for ethanol from lignocellulosic biomass: techno economic performance as development progresses. [en línea] Universiteit Utrecht Copernicus institute Science Technology Society.Holanda. <[http://www.senternovem.nl/mmfiles/149043_tcm24124362.pdf#search=%22Sun%20Y%2C%20Cheng%20J%20\(2002\)%20Hydrolysis%20of%20lignocellulosic%20%20%22](http://www.senternovem.nl/mmfiles/149043_tcm24124362.pdf#search=%22Sun%20Y%2C%20Cheng%20J%20(2002)%20Hydrolysis%20of%20lignocellulosic%20%20%22)> [Consulta 12 de septiembre del 2006].
- HATAKKA, A. 1983. Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymic saccharification of cellulose. Department of Microbiology, University of Helsinki, SF-00710 71, Finland.
- JARPA, S. 1988. Sacarificación de sustratos lignocelulósicos por HPB (Saccharification of lignocellulosic substrates by brown-rot fungi). Tesis (Magíster en Nutrición Humana). Universidad de Chile. 98p.
- OLIVA, JM. 2003. Efecto de los Productos de Degradación Originados en la Explosión a Vapor de Biomasa de Chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiología III. Madrid. 166pp. [En línea] <<http://www.ucm.es/eprints/4804>>, [consulta: 8 de septiembre del 2006].
- ROMANO, S., GONZALEZ, E Y LABORDE, M. 2005. Combustibles Alternativos. Red CYTED: Nuevas Tecnologías para la obtención de Biocombustibles. Ediciones Cooperativas. Buenos Aires, Argentina. 189p.
- SALAZAR O., B.C., BARBA P., ORELLANA C., ASENJO J.A. . 2006. Molecular Biotechnology, **33**: 211-220
- SANCHEZ, O Y CARDONA, A. 2005. Producción Biotecnológica de Alcohol Carburante II: Integración de Procesos. En Interciencia, Noviembre, vol. 30, número 011, 679-686. Caracas, Venezuela. 9p. [En línea] <<http://www.redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/339/33911004.pdf>>, [consulta: 8 de septiembre del 2006].
- TANIGUCHI, M.; H. SUZUKI; D. WATANABE; K. SAKAI; K. HOSHINO and T. TANAKA. 2005. Pretreatment evaluation with *Pleurotus ostreatus* in wheat straw enzymatic saccharification. Journal of bioscience and bioengineering. Vol.100, 637-643.
- TAPIA, C.; R. CARMONA; N. GÁLVEZ Y J. GONZÁLEZ. 2000. Caracterización del ataque de dos HPB en madera de Pino radiata por lignina Klason y espectroscopia FTIR. I Congreso Iberoamericano de Investigación y Desarrollo de Productos Forestales. Actas Concepción –Chile
- ZAID, L. 2004. Estudio del biodeterioro en madera de *Eucalyptus globulus* lab. por método gravimétrico. Tesis Ingeniería en la Madera, Escuela de Ciencias Forestales, Universidad de Chile. Santiago, Chile. 65p.