

Vigilancia Tecnológica de la obtención de enzimas celulolíticas para la obtención de etanol celulósico.

Monitoring Technology obtaining cellulolytic enzymes for cellulosic ethanol production

Yanet Bofill Rodríguez, Leyanis Mesa Garriga, Erenio González Suárez, Nelsy Herrera Coello
Centro de Análisis de procesos. Facultad Química-Farmacia.
Universidad “Central Marta Abreu” de Las Villas

Resumen

La producción de enzimas por bioprocesos es una alternativa para adicionar valor agregado a la biomasa lignocelulósica. El bagazo de caña de azúcar es un subproducto abundante de la industria azucarera y ha sido empleado como sustrato y fuente de carbono para la obtención de enzimas celulolíticas en el proceso de etanol celulósico. Las técnicas que se utilizan son la fermentación en estado sólido y fermentación sumergida donde los microorganismos degradan la celulosa. Las cepas con mejor capacidad celulolíticas son *Trichoderma reesei* mutante y su cepa original, *Trichoderma harzianum* y *Penicillium echinulatum*.

Palabras claves: Bagazo de caña de azúcar, producción enzimas celulolíticas, etanol celulósico

Abstract

The production of enzymes by bioprocesses is an alternative to add value to lignocellulosic biomass. Sugar cane bagasse is an abundant by-product of sugar industry and has been tested as support and carbon source for production of cellulolytic enzymes into ethanol process. The techniques used are solid state fermentation and fermentation submerged where the microorganisms degrade the cellulose. The strains with better cellulolytic activities are *Trichoderma reesei* mutant and parental, *Trichoderma harzianum* and *Penicillium echinulatum*.

Keywords: Sugar cane bagasse, cellulolytic enzyme production, cellulosic ethanol

Introducción

Para el proceso de obtención del Etanol Celulósico, a partir de residuos agroindustriales, es necesario la utilización de enzimas comerciales en la etapa de hidrólisis y es precisamente este producto lo que encarece el proceso; por tal motivo es que se ha realizado un estudio de vigilancia tecnológica en la obtención de enzimas celulolíticas, utilizando microorganismos, que disminuyan los costos de producción a nivel industrial. Se han alcanzado buenos resultados, a nivel mundial, en cuanto a microorganismos y sustratos empleados en la obtención de actividad enzimática pero falta, en nuestro país, una interrelación eficaz entre estos factores que permitan llegar a la meta. En Cuba no existe un trabajo experimental amplio sobre esta temática, en la Revista Centro Azúcar se han publicado artículos para la obtención de etanol utilizando enzimas comerciales, uno de ellos por Mesa, González et al., donde se señala que las principales dificultades en la etapa de hidrólisis enzimática de los materiales lignocelulósicos están relacionadas con la baja actividad específica de las enzimas de las que se dispone en la actualidad y, por tanto, con la necesidad de un elevado consumo de las mismas durante el proceso; y con la propia estructura de los sustratos lignocelulósicos nativos. El alto costo de las enzimas celulolíticas es, sin embargo, una de las principales barreras para hacer competitivo un proceso de obtención de etanol a partir de residuos lignocelulósicos, frente a otros procesos, (Mesa, González et al. abril-junio, 2008).

2. Sitios buscados

Se ha realizado un estudio de vigilancia tecnológica para conocer la situación, a nivel mundial, de la obtención de enzimas celulolíticas utilizadas en el proceso de etanol celulósico en varios sitios, dentro de los cuales se encuentran: www.elsevier.com y www.sciencedirect.com. En estos sitios, en las revistas afines a la temática, se reporta la obtención de etanol celulósico empleando enzimas comerciales. Sobre la obtención de enzimas usando sustratos lignocelulósicos pretratados existe un número de artículos reportados, lo que demuestra un creciente nivel de investigación en la obtención de enzimas celulolíticas que disminuyan los costos en el proceso de etanol celulósico.

Patentes

Las patentes han sido buscadas en el sitio esp@cenet database - LP - esp@cenet. Estados Unidos reporta la patente para la producción de bioetanol empleando biomasa lignocelulósica (bagazo de caña de azúcar, remolacha y maíz), que incluyen pretratamiento de explosión con vapor, simultánea sacarificación y fermentación (SSF) pero utilizan enzimas comerciales. Se destaca también tres ventajas de la hidrólisis enzimática de la celulosa por encima de la hidrólisis ácido-catalítica: altos rendimientos, bajos costos de equipamiento ya que se llevan a cabo a presión atmosférica y bajas temperaturas, y no son producidas sustancias tóxicas como resultado de la degradación de azúcares, las cuales pueden ser un obstáculo para la fermentación, (Ballesteros, Ballesteros et al. 2002). Se reporta una patente donde se utiliza el bagazo de caña de azúcar en la obtención de enzimas celulolíticas. Uno de los países con mayor número de patentes en la obtención de enzimas celulolíticas en distintos sustratos es China. Una de ellas reporta un tipo de enzima con alta actividad celulasa y su proceso de preparación. La enzima es obtenida por basidiomicetos, la cepa es inoculada en un medio que contiene salvado de trigo como biomasa lignocelulósica, además de las sales que comúnmente se utilizan y Tween 80, la fermentación se realiza en frascos Erlenmeyer por 96-120 h. La invención tiene como ventajas la estabilidad del proceso de producción, menos infección de bacteria extrañas y realizar una apropiada producción industrial. La celulasa producida tiene una actividad de 40000 u/g, (Shufeng, Fang et al. 2005). La presente invención se refiere a nuevos procedimientos de regulación de la expresión genética en las plantas, se refiere también a la producción de enzimas que degradan la celulosa en las plantas, mediante técnicas de ingeniería genética, se utilizan, preferentemente, los promotores con inducción química, de manera que la expresión en las plantas de los genes de celulasa transformados, pueda inducirse químicamente. el campo de aplicación se extiende a cualquier proceso industrial que requiera una abundante cantidad de celulasas, pero en particular a la conversión de biomasa celulósica en etanol, (Lebel, Heifetz et al. 2005). La invención siguiente abarca los campos de biotecnología, bioquímica y microbiología,

la misma relata la producción de celulasa en cultivo sumergido por el cultivo del hongo *Trichoderma viride* 44-11-62/3. Los sustratos empleados son almidón de maíz y salvado de trigo como fuente de carbono. El método proporciona un incremento de celulasa en el cultivo crecido (27U/mL), y su efecto es mejoras en el rendimiento enzimático, (Vasil, Ogorel et al. 2001). No existen reportadas muchas patentes donde se utilice el bagazo de caña de azúcar como biomasa lignocelulósica, sin embargo se reportan otros sustratos como el salvado de trigo, remolacha y el almidón de maíz.

Microorganismos

En la obtención de enzimas, en Brasil, se ha utilizado la cepa *Pleurotus sajorcaju* PS2001, hongo de blanca putrefacción, el cual preferiblemente ataca la lignina, el mismo se utiliza en el pretratamiento del bagazo de la caña de azúcar, luego se utiliza otra especie, *Penicillium echinulatum*, para la producción de celulasas y xilanasas, (Camassola and Dillon 2009).. Uno de los microorganismos celulolíticos más extensivamente estudiados es el hongo de putrefacción blanda *Trichoderma reesei*, el cual es también usado industrialmente para la producción de enzimas. *Trichoderma reesei* ha sido mejorada durante años por mutagénesis. En un estudio realizado en Dinamarca, también se utiliza *Trichoderma reesei* Rut C-30 para la producción de enzimas celulasas, además de hemicelulasas y pectinazas, empleando diferentes materiales lignocelulósicos como fuentes de carbono, los cuales son celulosa pulpa de remolacha y extracto alcalino de pulpa de remolacha. Los resultados fueron los siguientes: la máxima actividad endoglucanasa alcanzada estuvo en el rango de 0.07 y 0.49 U/mL. La celulosa indujo el nivel superior de actividad endoglucanasa, 0.19 U/mL, mientras AE pulpa de remolacha como sustrato trajo como resultado una alta actividad enzimática (2.3 U/mg proteína), (Olsson, Christensen et al. 2003). En el mismo país se ha estudiado la capacidad del hongo filamentoso *Trichoderma reesei* Rut C-30 para sintetizar enzimas celulasas utilizando altas concentraciones de de celulosa (50g L⁻¹) y lactosa (150g L⁻¹) y generar 2-3 veces de actividad enzimática superior que otros medios probados, así es reportado, en Canadá, por (Ahamed and Vermette 2008). Fue inducida variabilidad genética para la secreción de celulasa en las cepas *Penicillium echinulatum* y *Trichoderma harzianum* por fusión protoplástica. Las

fusiones resultantes, morfológicamente más similar a la cepa original *P. echinulatum*, mostraron variable capacidad para secretar celulasas en ambos cultivos sumergido y en estado sólido. Lo que es más importante, algunas de estas fusiones mostraron superior protagonismo enzimático de FPA y α -glucosidasa, en comparación a la cepa original *P. echinulatum*, la cual secreta celulasa a rendimiento cerca de 130 FPU g⁻¹ de celulosa, similar a la cepas mutante de *Trichoderma reesei* bajo las mismas condiciones. La significancia de estos resultados es principalmente debido a el factor que los mutantes de *P. echinulatum* son microorganismos muy importantes para la secreción de celulasas en la hidrólisis de celulosa con vistas a la producción de etanol de segunda generación, (Dillon, Camassola et al. 2008). En general, estos resultados muestran que la fusión protoplástica puede ser usada como una herramienta clave en el mejoramiento genético para generar mejores cepas celulolíticas. En Estados Unidos se ha realizado una investigación sobre la producción de celulasa en cocultivos de la levadura *Hypocrea jecorina* Rut 30, y el hongo *Candida bombicola* usando glicerol como fuente de carbono y energía, (Lo and Ju 2009). En un estudio realizado en Francia, en colaboración con la India y México, los autores reportan la utilización del hongo filamentoso *Trichoderma harzianum*. La preparación del inóculo fue por esporas por el crecimiento reciente en APD inclinado (28 \pm ° C, 6días), (Roussos, Raimbault et al. 1991). En Perú se han realizado varios estudios con el objetivo de la obtención de enzimas celulasas. Uno de ellos reporta la utilización de *Trichoderma reesei* LM-UC4 y *Aspergillus niger* QM329 en bagazo de caña de azúcar. Significativamente altas actividades de todas las enzimas celulasas fueron observadas en 4 días de cultivo mezclado en SSF comparadas con cultivo simple (*T. reesei*). La superior actividad FPA y α -glucosidasa se vieron en cultivo mezclado y fueron 18.7 y 38.6 IU/g peso seco, respectivamente, representando aproximadamente 3 a 5 veces aumentada por encima de las actividades obtenidas en cultivo simple, (Dueñas, Tengerdy et al. 1995). Luego se utilizó *Trichoderma reesei* LM-UC4, la cepa original, y la hipercelulolítica mutante LM-UC4E1, ambas fueron co-cultivadas con *Aspergillus niger* ATCC10864 en SSF con bagazo de caña de azúcar. El tipo de inoculación fue por

esporas, las cuales fueron lavadas a los 7 días con 10 mL de solución estéril 0.01% de Tween 80, 2 mL (10^7 esporas/mL). La cepa mutante fue más sensible al cultivo mezclado que la cepa original cuando *A. niger* la parte cooperativa. En una mezcla de cultivos mutantes con fuente inorgánica de nitrógeno fueron producidas, 10% más de biomasa, 63% más de celulasa, 85% más de endoglucanasa y 147% más de α -glucosidasa que en cultivo simple, (Gutiérrez-Correa, Portal et al. 1999). En la figura 4.1 se observan los hongos más utilizados en la producción de enzimas celulolíticas

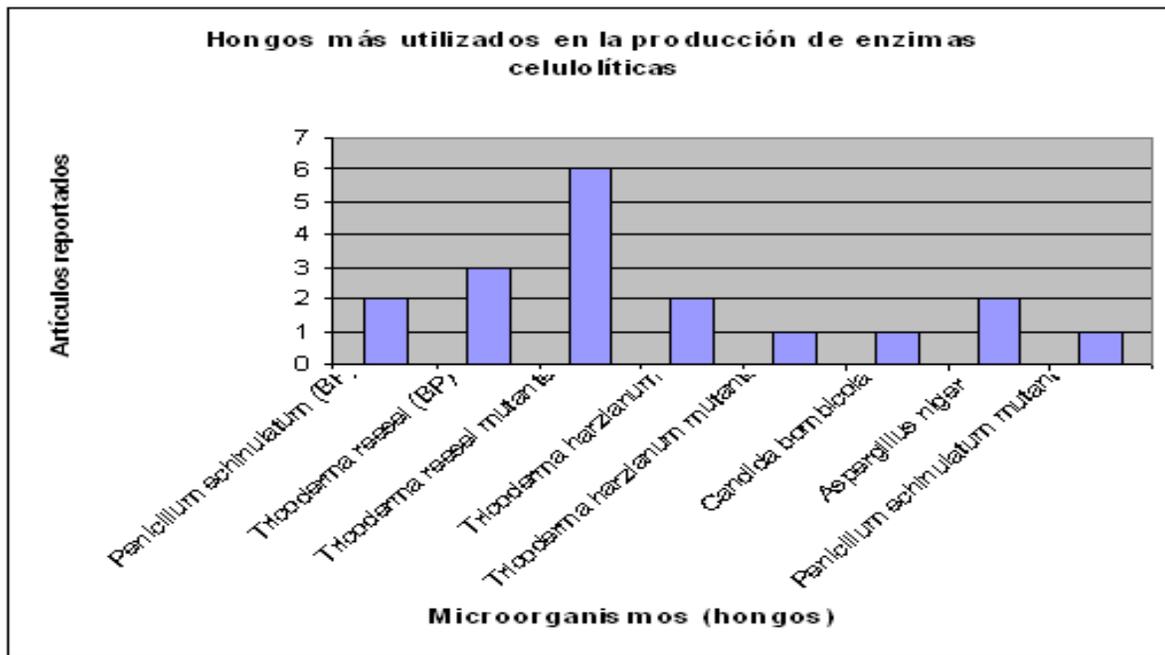


Figura 4.1 Microorganismos más utilizados en la producción de enzimas celulolíticas.

Sustratos

Se ha obtenido una productividad total del volumen de enzima ($69.8 \text{ UL}^{-1} \text{ h}^{-1}$) por la cepa *Trichoderma reesei* ha sido obtenida. La máxima actividad celulasa fue de (5.02 FPU mL^{-1}) y la productividad de enzima ($69.8 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) utilizando como sustrato celulosa con una concentración de 50 g L^{-1} a las 120 h, (Ahamed and Vermette 2008). Las fuentes de carbono empleadas como sustrato en la obtención de enzimas celulasas fueron: Sigmacell cellulose (SC), abeto pretratado con vapor (SPS) y una mezcla de SC y abedul (SCXX). La superior actividad papel de filtro, 0.59 FPU mL^{-1} , fue medida después de 165 h de cultivación en el SPS y la inferior, 0.30 FPU mL^{-1} , fue archivada en la mezcla SCXX, la cual contenía 10 g L^{-1} de celulosa comparada con 20 g L^{-1} en los dos otros cultivos. Por el contrario, las superiores actividades de enzimas hemicelulasas (endoxilanasas, α -xilosidasas, α -galactosidasas y α -L-arabinofuranosidasas) fueron medidas en SCXX, (Jørgensen and Olsson 2006). La producción de celulasas fue analizada por el hongo *Trichoderma harzianum*, cultivado en diferentes sustratos celulósicos por fermentación sólida. Los resultados indicaron que la producción más alta de celulasas (CMCasa 210 IU/g SDM y FPA 200 IU/g SDM) se obtuvo empleando bagazo de caña de azúcar mezclado con salvado de trigo en una proporción 80:20 (w/w). Cuando se utilizaron ambos sustratos individualmente, se produjeron menos celulasas y se requirió más tiempo de fermentación. Por otro lado, los resultados demostraron la posibilidad de obtener diferentes relaciones de actividades carboximetil celulasa (CMCasa) y papel filtro (FPA), utilizando sustratos específicos y deteniendo la fermentación a diversos tiempos. El uso del bagazo agotado de remolacha y del salvado de trigo como sustratos para el crecimiento de *T. harzianum* reveló que la producción de celulasa fue baja, mientras que la producción de proteínas fue bastante elevada. Por esta razón, desde el punto de vista económico, sería más atractivo explotar estos sustratos preferentemente para el enriquecimiento proteico de la cepa, (Roussos, Raimbault et al. 1991). El bagazo de caña de

azúcar fue utilizado como sustrato en la obtención de enzimas celololíticas. El bagazo tenía la siguiente composición: 44% celulosa, 20% lignina, 23% hemicelulosa, 7.5% extractivos, 3.5% ceniza y 2% proteína, en base seca. Fue mezclado con NH_4OH y esterilizado a 121°C por 1.5 h., (Dueñas, Tengerdy et al. 1995). El mismo material fue lavado, secado y molido en partículas de 1-2 mm, (Gutiérrez-Correa, Portal et al. 1999)

Técnicas más empleadas

Unas de las técnicas más utilizadas son la fermentación en estado sólido (SSF) y la fermentación sumergida (FS). La SSF ha sido también aplicada en la producción de enzimas, antibióticos y en la producción de productos de alto valor agregado por residuos agroindustriales. La producción de enzimas por (SSF) ha ganado mucho la atención en estudios biotecnológicos. El empleo de residuales de bajo costo, altas productividades, pocos requerimientos energéticos, baja producción de aguas residuales, extendida estabilidad de los productos y bajos costos de producción son algunas de las ventajas de este tipo de fermentación. Se han utilizado para este tipo de técnica materiales lignocelulósicos como: bagazo de caña de azúcar, paja de arroz y maíz, paja de trigo, pulpa de remolacha, etc.

Para la obtención de enzimas xilanasa y exopoligalacturonasa se ha empleado la técnica SSF *Aspergillus awamori*, siendo una clave importante en la mejora del sistema de producción de enzimas, (Díaz, Caro et al. 2007). En un mismo estudio se investigaron dos técnicas, SF Y SSF. Para evaluar la secreción de celulasa en SSF de las cepas original *P. echinulatum* y *T. harzianum* y sus fusiones fueron crecidas en un medio con salvado de trigo. Similar para el cultivo sumergido, la actividad enzimática de extractos cosechados por los cultivos de SSF muestra niveles variables frente a las cepas. Un clon particular, BP2, mostró valores de actividad FPA de aproximadamente 2UI mL^{-1} , en cultivo sumergido y todas las cepas seleccionadas mostraron superior secreción de celulasa en cultivos en estado sólido, en comparación con la cepa original de *P. echinulatum*, (Dillon, Camassola et al. 2008). Se ha utilizado la SSF en cuatro diferentes sustratos,

en combinación e individualmente, los cuales son: bagazo de caña de azúcar, salvado de trigo, paja de trigo, y pulpa de remolacha, con la adición de sales minerales. Esta técnica fue llevada a cabo en columnas (210 mm largo x 22 mm ancho) con ligero empaque a $28\pm^\circ\text{C}$ y el medio fue oxigenado a una velocidad de 5L aire humidificado $\text{h}^{-1}\text{column}^{-1}$, (Roussos, Raimbault et al. 1991). Primeramente se estudio la SSF en bagazo de caña de azúcar en cultivo mezclado de las cepas *Trichoderma reesei* LM-UC4 y *Aspergillus niger* QM329. Además de alcanzar altas actividades enzimáticas con esta mezcla, también fue convertida alrededor del 46% de la celulosa y hemicelulosa en azúcares reductores. La productividad de biomasa, $0.29\text{ g L}^{-1}\cdot\text{h}$ y la productividad de enzima, $28.0\text{ IU L}^{-1}\cdot\text{h}$, fueron mejoradas en cultivo mezclado, (Dueñas, Tengerdy et al. 1995). Se utilizó la SSF en el bagazo de caña de azúcar, cada frasco fue inoculado con 1.5% (w/w) *T. Reesei*, LM-UC4 o LMUC4E1 e incubados a 30°C con una humeada de 95%. El micelio *A. niger* fue adicionado a cada frasco a las 36 h. Se utilizaron como control las tres cepas de los cultivos simples, (Gutiérrez-Correa, Portal et al. 1999). En los procesos de SSF se impone la utilización de sustratos como bagazo de caña de azúcar como inerte natural. Gutiérrez-Correa et al., presentan un nuevo concepto de SSF, señalando que contrariamente a la creencia común, la ventaja de la SSF está relacionada a la adhesión de los hongos a partículas sólidas y no al bajo contenido de agua. Por lo tanto, la SSF y la fermentación en biopelículas (erradamente conocida como inmovilización por adsorción) son variantes técnicas del mismo proceso biológico y deben ser referidas como Fermentación por Adhesión a Superficies, (Gutiérrez-Correa and

Conclusiones

Por la vigilancia tecnológica realizada podemos concluir que el hongo que más se ha utilizado en la producción de enzimas celololíticas es *Trichoderma reesei* mutante, seguido de su cepa original y de las cepas *Trichoderma harzianum* y *Penicillium echinulatum*. El bagazo de caña de azúcar es una de las biomazas lignocelulósicas más empleadas en la producción de enzimas, su utilización en conjunto con los microorganismos reportados puede ser un camino certero para la obtención de enzimas,

reduciendo así los costos de producción en el proceso de etanol celulósico.

Proyecciones

Se propone primeramente trabajar con las cepas de probada actividad celulolítica (*Trichoderma reesei*, *Trichoderma harzianum* y *Penicillium echinulatum*), realizando las técnicas de mutagénesis. Se deben realizar pretratamientos biológicos con hongos de blanca putrefacción, con alto potencial para la degradación selectiva de lignina, y pretratamientos alcalino-ácido en bagazo de caña de azúcar. Es necesario estudiar las técnicas de SSF y SF para cada microorganismo. Evaluar el comportamiento de los microorganismos variando concentración del inóculo, pH, temperatura, velocidad de agitación, tipo de inoculación, tiempo de pretratamiento, fuentes de carbono y nitrógeno para lograr una actividad enzimática similar a las de las enzimas comerciales

Referencias

1. Ahamed, A. and P. Vermette (2008). "Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions." Biochemical Engineering Journal **40**: 399-407.
2. Ballesteros, I., M. Ballesteros, et al. (2002). Procedure for the production of ethanol from lignocellulosic biomass using a new heat-tolerant yeast. C. I. E. C. [US]. United States.
3. Camassola, M. and A. J. P. Dillon (2009). "Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*." Industrial Crops and Products **29**: 642-647.
4. Díaz, A., I. Caro, et al. (2007). "Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolytic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace." Enzyme and Microbial Technology **41**: 302-306.
5. Dillon, A. J. P., M. Camassola, et al. (2008). "Generation of recombinant strains to cellulase production by protoplast fusion between *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma harzianum*." Enzyme and Microbial Technology **43**: 403-409.
6. Dueñas, R., R. P. Tengerdy, et al. (1995). "Cellulase production by mixed fungi in solid-substrate fermentation of bagasse." World Journal of Microbiology & Biotechnology **11**: 333-337.
7. Gutiérrez-Correa, M., L. Portal, et al. (1999). "Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse." Bioresource Technology **68**: 173-178.
8. Gutiérrez-Correa, M. and G. K. Villena (2003). "Surface adhesion fermentation: a new fermentation category." Rev. perú. biol **10**(2): 113-124.
9. Jørgensen, H. and L. Olsson (2006). "Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888-Effect of substrate on hydrolytic performance." Enzyme and Microbial Technology **38**: 381-390.
10. Lebel, G., B. Heifetz, et al. (2005). Plantas transgénicas que expresan enzimas celulolíticas. S. P. AG. United States.
11. Lo, C.-M. And L.-K. Ju (2009). "Sphorolipids-induced cellulase production in cocultures of *Hypocrea jecorina* Rut C30 and *Candida bombicola*." Enzyme and Microbial Technology **44**: 107-111.
12. Mesa, L., E. González, et al. (abril-junio, 2008). "La producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos. Estado del arte." Centro Azúcar **35**(2): 29-33.
13. Olsson, L., T. Christensen, et al. (2003). "Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30." Enzyme and Microbial Technology **33**: 612-619.
14. Roussos, S., M. Raimbault, et al. (1991). "Kinetics and ratios of carboxymethyl-cellulase and filter paper activities of the cellulolytic enzymes produced by *trichoderma harzianum* on different substrates in solid state fermentation." MICOL. NEOTROP. APL. **4** 19-40.

15. Shufeng, C., T. Fang, et al. (2005). High-activity cellulase and its preparation method. A. O. S. G. A. [CN]. China.

16. Vasil, A., B. Ogorel, et al. (2001). Cultural medium for preparing enzyme cellulase in its industrial production by submerged culturing fungus trichoderma viride 44-11-62/3 and method of preparing enzyme cellulase on this medium. O. VOSTOK.