Degradación Enzimática de Madera Previa Deslignificación Parcial y Tratamiento Alcalino

Brunaud E., Melo R. y Pereira M.
Lab. Prod. Forestales – U de Concepción

INTRODUCCIÓN

La hidrólisis de material lignocelulósico es de gran interés comercial debido, principalmente, al enorme potencial de uso que presenta la glucosa, principal producto de este proceso. En particular, el etanol, producto que puede ser derivado de la glucosa, es uno de los que genera mayor expectativa debido a su potencial uso como combustible alternativo en mezcla con combustibles fósiles o como aditivo para aumentar el octanaje. Las principales ventajas del uso de combustibles basados en biomasa son la característica renovable de la fuente y la reducción de las emisiones gaseosas. Por otra parte, se visualiza un creciente interés por el uso de "biocombustibles" así como, también, la necesidad de buscar nuevas fuentes de energías.

Los actuales métodos de degradación de material lignocelulósico comprenden el tratamiento ácido y el enzimático. La hidrólisis ácida de celulosa se aplica, exitosamente a nivel industrial; sin embargo, la técnica enzimática presenta ventajas debido a la menor formación de productos secundarios y menor pérdida de azúcares producidos, por lo que se obtiene mejores rendimientos.

El presente trabajo tiene como objetivo general estudiar la degradabilidad de la madera mediante un método enzimático, para la producción de glucosa, utilizando madera de E. maidenii.

ANTECEDENTES

La hidrólisis de la madera ha sido tema de estudio durante muchos años. De los componentes que están presentes en la madera sólo la celulosa y hemicelulosas son hidrolizables; por tal motivo, las reacciones han sido más extensamente estudiadas sobre celulosa pura (Goldstein,1981).

Los productos de la hidrólisis son azúcares simples, la solución producto de la depolimerización ácida contiene entre 4-6% de azúcares. Los rendimientos típicos promedios oscilan entre el 30 y 35% en base a madera seca, valor que depende, en gran medida, de la materia prima utilizada (Chandía 1983, Camacho y col., 1996).

La hidrólisis ácida provee cinéticas más rápidas que las obtenidas por medio de enzimas, pero la generación de productos laterales, tales como el furfural o hidroximetilfurfural, pueden dificultar la utilización de los licores de reacción en su procesamiento posterior. La hidrólisis enzimática, por otra parte, provee de reacciones más selectivas y en condiciones de operación más suaves.

Las enzimas son biocatalizadores de naturaleza proteica, formados por cadenas de polipéptidos con peso molecular elevado no dializable y termolábil.

Los factores que influencian la catálisis enzimática son, principalmente, la concentración de la enzima, la concentración del sustrato, el pH y la temperatura. Los dos últimos son específicos para cada tipo de enzima.

En sustratos lignocelulósicos como la madera, se ha descubierto que los componentes del sistema celulasa, de cualquier organismo, son múltiples y variados según Hayn (1985) y Knowles(1987) citados por Klyosov en el "Tratado Industrial de Ingeniería Enzimática", la resolución de un sistema enzimático, de una sola fuente, reveló entre 15 y 20 componentes individuales.

Esta compleja naturaleza de las enzimas celulóticas y la super estructura del material lignocelulósico, representan significativas complejidades para el estudio de los mecanismos de acción enzimáticos.

La teoría de la hidrólisis enzimática de celulosa nativa señala que el proceso se realiza gracias a la interacción sinérgica de las glucanasas y celobiasas para producir celobiosa, la cual, es subsecuentemente dividida a glucosa (Mansfield 1999).

Este mecanismo simplificado resulta de gran utilidad para comprender el proceso de hidrólisis enzimática sobre la celulosa; sin embargo la acción específica de las diferentes enzimas en compuestos lignocelulósicos es más compleja y depende de factores propios del material a hidrolizar, tales como el grado de polimerización, cristalinidad de la celulosa, tamaño de la partícula, distribución de lignina, entre otros (ver Mansfield 1999) y de factores propios del complejo enzimático tales como sinergismo, adsorción, inhibición, etc.

Debido a la alta complejidad del material lignocelulósico, se hace necesario, para estudios de degradabilidad enzimática, dar tratamientos a la madera, previos a la etapa de hidrólisis; sin embargo, el entendimiento de cómo éstos facilitan la degradación es aún limitado. Existen muchos métodos de tratamiento de la madera previos a una hidrólisis enzimática que se clasifican en tres grandes grupos: mecánicos, químicos y biológicos.

La madera, convenientemente astillada, se sometió a pretratamientos antes de su procesamiento con las enzimas adecuadas.

METODOLOGÍA

La metodología de trabajo consta de tres partes fundamentales: En la primera, se efectuó la biosíntesis de las enzimas involucradas en la degradación del material con el fin de tener una visión global de los requerimientos del proceso. En una segunda etapa, se efectuaron pretratamientos a la madera de *Eucalyptus maidenii*, para mejorar la susceptibilidad del sustrato y promover la extensiva conversión de éste. Los pretratamientos efectuados fueron: Deslignificación parcial al sulfito neutro seguida de una desfibración mecánica en discos planos y tratamiento alcalino de la pulpa con agentes hinchantes.

Finalmente, se efectuó la hidrólisis propiamente tal, y se determinó el efecto de las cargas de reactivos en las etapas químicas, los efectos de la actividad enzimática y la concentración del sustrato sobre el rendimiento global de la hidrólisis.

PREPARACIÓN DE LAS ENZIMAS:

Se obtuvieron complejos enzimáticos desde las especies T. viride (celulasas) y A. niger (b-glucosidasa), en medios de cultivos especiales, para ambos microorganismos, como se especifica en tabla N°1.

Se prepararon 250 ml de cada medio de cultivo y se inoculó el cultivo de cada hongo. La temperatura se mantuvo constante a 23°C con agitación orbital durante siete días. Durante este período se determinó la producción de enzima midiendo la cantidad de glucosa liberada al poner en contacto una muestra del medio con una fuente de celulosa patrón.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo.

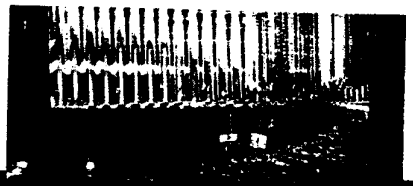
Hongo Incubado	T. viride		A. niger	
Medio	Medio A	Medio B	Medio C	Medio D
Composición	Ext. Malta 10 g/l	Ext. Malta 10 g/l	Ext. Malta 10 g/l	Ext. Malta 10 g/l
	Glucosa 5 g/l	Glucosa 5 g/l	Glucosa 5 g/l	Glucosa 5 g/l
	Peptona 1 g/l	Peptona 1 g/l	Peptona 1 g/l	Peptona 1 g/l
		Carboximetilce-lulosa, 4,8 g/l		Celobiosa 4,8 g/l

Con las enzimas obtenidas se realizó un análisis de sensibilidad de la actividad enzimática con las variables de temperatura y pH. Los resultados se muestran en el gráfico N°3.(figura 3.6)

PRETRATAMIENTOS DE LA MADERA

Los efectos de los pretratamientos sobre la hidrólisis enzimática fueron evaluados a través de un diseño experimental factorial con puntos estrellas adicionales, considerando las principales variables de cada pretratamiento y las principales variables asociadas a la enzima que afectan la hidrólisis enzimática. Las variables manipuladas y los rangos de operación se especifican en la tabla N°2.

GALVANIZADO POR INMERSIÓN EN CALIENTE



La forma más eficiente y segura de mantener inalterables sus piezas de acero y también su presupuesto

Grupo Imsa Chile S.A. implementó el Sistema de Aseguramiento de la Calidad bajo el estándar de la Norma Internacional ISO 9001:2000 certificado por ABS Quality Evaluations Inc., lo que sumado a un mejoramiento continuo de nuestros procesos productivos e infraestructura, nos permite ofrecer un servicio de galvanizado de la más alta calidad y confiabilidad.

- El espesor del galvanizado puede ser medido, controlando la vida útil del recubrimiento y controlar y prolongar eficientemente su duración.
- Resistente a la corrosión, según el medio en que este sometido (marinos de sobre marea, de marea y zona de marea; Atmósferas industriales moderadas y severas; Atmósferas urbanas y rurales).
- Más rápido que la pintura ya que no requiere condiciones ambientales especiales para su aplicación.
- Mayor resistencia mecánica a golpes y raspaduras.
- Mayor versatilidad porque puede ser aplicado en piezas de distinto tamaño y formas.
- Recubrimiento total y homogéneo.
- Mínima mantención.
- Fácil de soldar.

instapanel

Planta Talcahuano: Av. Gran Bretaña 1925 • Talcahuano, Chile • Fono (56 41) 541777 • Fax (56 41) 549442

www.instapanel.cl • e-mail: mpezo@instapanel.cl

Tabla 2. Definición y rangos de variación de los factores.

Variable	Nomenclatura	Unidades	Rango de variación
Razón Na_2SO_3/madera	RSM	% bms	30 - 80
Concentración de NaOH	CHS	% p/v	3-8
Concentración de sustrato	CS	% p/v	2 - 5
Actividad Enzimática	AE	FPU/ml	0,1 - 0,25

FPU: Unidades papel filtro.

Las principales variables respuestas observadas fueron: Retención de polisacáridos, conversión de carbohidratos en azúcares reductores, concentración de azúcares reductores en la solución producto, rendimiento de la hidrólisis del proceso global.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción del complejo enzimático:

En los gráficos 1 y 2 (gráficos 3.3 y 3.4) se observa la evolución de la producción de celulasas y b-glucosidasa, respectivamente, en el medio de cultivo, medido como la cantidad de glucosa liberada (mg). En ellos se puede observar que alrededor del cuarto día (96 horas aprox.) se obtiene la máxima producción de enzimas, lo que concuerda con lo reportado con otros autores (Tao 1997). Tiempos mayores a 120 hrs como lo reportado por Ghose (1975) citado por Rose, se deben fundamentalmente, a la mayor dilución del inóculo en el medio lo que provoca tiempos muertos en el crecimiento de la colonia.

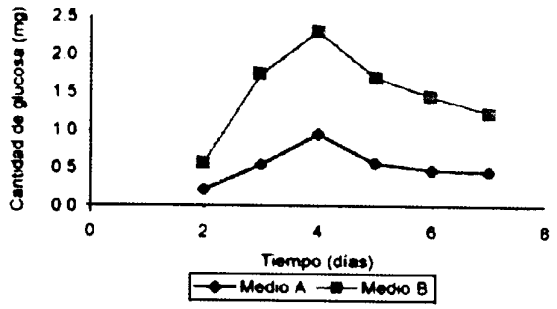


***Gráfico 1.** Actividad de la enzima en función de la temperatura y el pH*

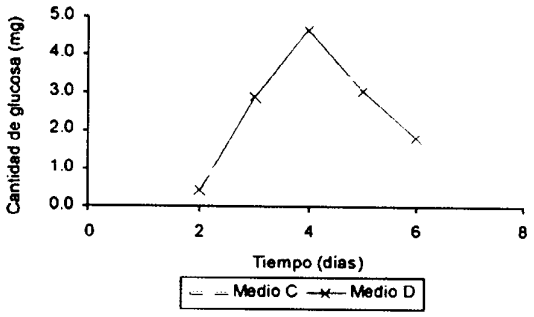


***Gráfico 2.** Actividad de la enzima en función de la temperatura y el pH*

En el gráfico 1, es destacable la diferencia en los resultados obtenidos entre el medio A y el B. Se observa que en el punto de máxima producción el medio B duplica al medio A, que solo contiene glucosa. Este resultado está en concordancia con los obtenidos por Mandels (1969), citado por Rose en 1980, que obtuvo producciones óptimas de enzimas al usar celulosa entre 0,5 y 1 % (similar al medio B). Algo similar, pero menos notorio, se observa en la producción de b-glucosidasa, donde se obtienen resultados más deficientes en el medio que sólo contiene glucosa.

Los valores de actividad enzimática de los diferentes medios y colonias se resumen en la Tabla 3. En ella se puede observar que en general los valores de actividad enzimática encontrada en este estudio son de órdenes de magnitud similares a los reportados por otros autores, para otras especies fúngicas y medios de cultivo.

Tabla 3. Valores de actividad enzimática y de los diferentes medios y colonia.

Ensayo	Fuente de Carbono	Glucosa Liberada (mg)	Actividad estimada	Actividad precipitada
A	Glucosa	0,95	0,087 (FPU/ml)	0,82 (FPU/ml)
B	Carboximetilcelulosa	2,31	0,231 (FPU/ml)	2,38 (FPU/ml)
C	Glucosa	3,82	0,353 (CBU/ml)	3,76 (CBU/ml)
D	Celobiosa	4,64	0,431 (CBU/ml)	4,90 (CBU/ml)

La mayor parte de la información respecto a actividad enzimática reportada en literatura se encuentra detallada para soluciones enzimáticas purificadas a través de distintos tratamientos. Nakamura (1988) menciona actividad de un medio sin purificar a partir de *cellumonas uda* y obtuvo 0,234 U/ml de actividad medidas con celulosa cristalina Avicel, como sustrato. Este valor es del mismo orden de magnitud que el de este estudio. En otro estudio realizado por T. Wood (1988), utilizando *Trichoderma koningii*, obtuvo 3,6 U/ml de actividad de endoglucanasa

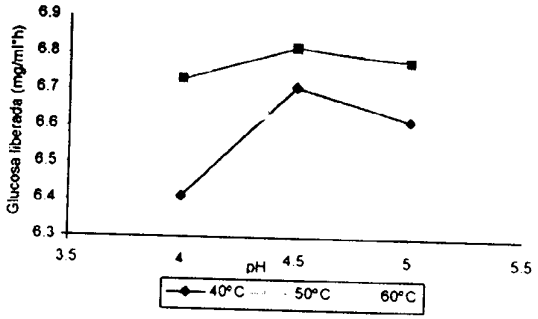


Gráfico 3. *Actividad de la enzima en función de la temperatura y el pH*

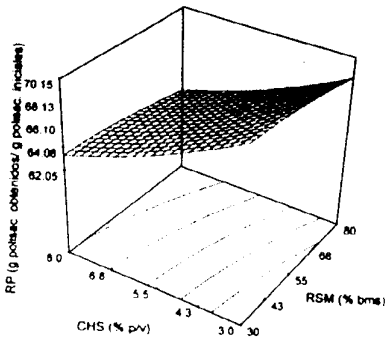


Gráfico 4. *Retención de polisacáridos después de deslignificación parcial y tratamiento hinchante con NaOH*

y 0,424 U/ml de actividad de b-glucosidasa, medida después de realizar la precipitación con sulfato de amonio. Por último se puede citar a Tanaka (1988) que realizando un estudio con *Eupenicilium javanicum*, obtuvo 2,49 U/ml de actividad , utilizando carboximetilcelulosa como sustrato.

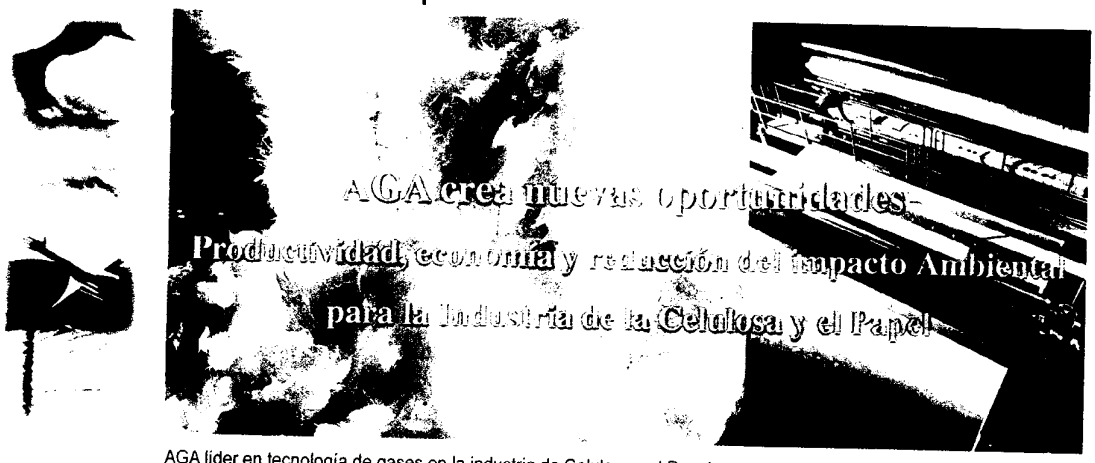
El gráfico 3(figura 3.6), muestra la variación de la glucosa liberada por una solución enzimática puesta en contacto con una muestra equivalente de papel filtro a distintos niveles de temperaturas y pH. En él se puede observar que se obtienen mayores valores de glucosa para una temperatura de 50°C y un pH cercano a 4,5. Esto coincide con otros autores que sugieren un pH óptimo de trabajo de 4,8. Al realizar una prueba a 50°C y un pH de 4,8 se obtuvo un leve aumento a 6,85 mg de glucosa por lo que se tomó como pH óptimo para los siguientes ensayos.

PRETRATAMIENTOS

A partir de ensayos preliminares se determinaron condiciones para los pretratamientos y los rangos en los cuales se estudiaron los efectos de las variables manipuladas (ver tabla 4). Para el caso de la hidrólisis enzimática se fijó, como se estableció anteriormente, la temperatura en 50°C y el pH en 4,8. Se varió, entonces, la actividad enzimática del medio y la concentración del sustrato (pulpa con pretratamientos).

AGA

Member of the Linde Gas Group



AGA líder en tecnología de gases en la industria de Celulosa y el Papel.
"Felicita a la Industria de Celulosa en Chile por sus significativos avances en la reducción de químicos en el blanqueo con su correspondiente disminución del impacto en el medio ambiente".

Oficinas centrales
Paseo Pdte Errázuriz E. 2631 piso 4 Providencia Santiago
Tel: 02-3308000
Fax; 02-2318009

Suc AGA Concepción
Rengo 1521
41-240842
41-225055

Planta de Gases del Aire Certificada según norma ISO 9002

Tabla 4. Condiciones de operación para pretratamientos

Deslignificación Parcial	
Variables	Valores
Tiempo para alcanzar Temperatura máxima (min)	120
Temperatura máxima (ºC)	170
Tiempo a temperatura maxima (min)	120
% sulfito de sodio % (bms)	30 - 80
Razón Sulfito/Bicarbonato (g/g)	4/1
Razón Licor Madera (ml/g)	4/1

Hinchamiento con NaOH	
Variables	Valores
Tiempo para alcanzar Temperatura máxima (min)	30
Temperatura máxima (ºC)	100
Tiempo a temperatura maxima (min)	180
% NaOH (p/V)	3 - 8
Consistencia (g pulpa/g totales)	77

En el gráfico 4 (figura 3.7) se muestra la retención de polisacáridos en función de la variación de la razón sulfito/madera (RSM) y la concentración de hidróxido de sodio (CHS). Como puede observarse la menor pérdida de polisácaridos se obtiene cuando las condiciones de ambos pretratamiento son los más suaves; sin embargo, debe destacarse que la mayor pérdida de polisacáridos se debe a la acción de la soda en la etapa de hinchamiento, como puede verse en el gráfico 5 (figura 3.5). Por otra parte se observa que la razón sulfito madera en la deslignificación parcial tiene muy poco efecto en la pérdida de polisacáridos.

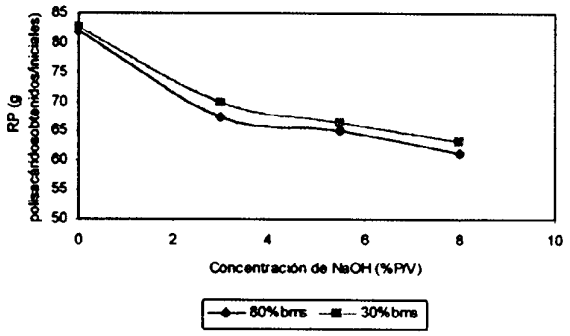


Gráfico 5. *Pérdida de polisacáridos en el tratamiento con agentes hinchantes*

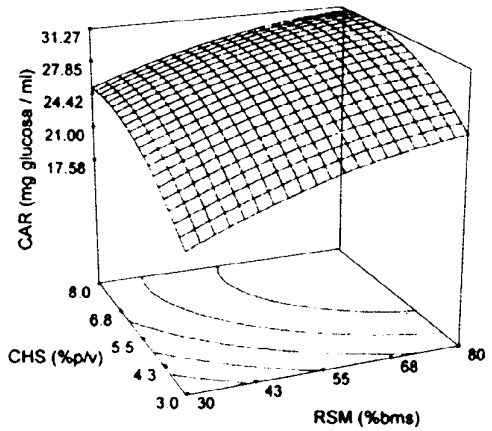


Gráfico 6. *Concentración de azúcares reductores en la solución producto. CS= 3.5 % P/V. AE= 0,175 FPU/ml.*

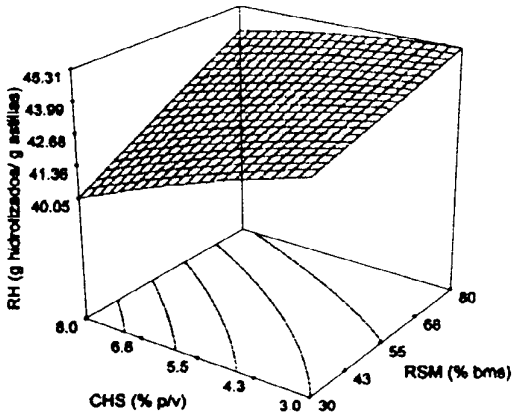


Gráfico 7. *Rendimiento de la hidrólisis. CS=2% P/V, AE= 0,25 FPU/ml.*

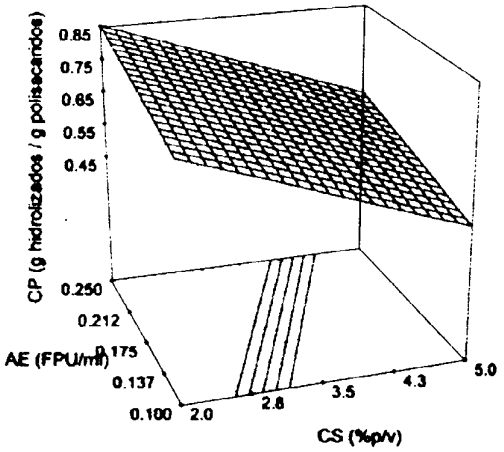


Gráfico 8. *Conversión de polisacáridos. RSM= 55, CHS=5,5.*

Es importante notar que, a pesar de la pérdida de polisacáridos que produce el tratamiento con soda cáustica, este tratamiento promueve una mayor hidrólisis enzimática, lo que se refleja en una mayor concentración de azúcares reductores en la solución producto, como se muestra en el gráfico 6 (figura 3.11) donde la concentración de azúcares reductores alcanza un máximo para valores altos de CHS y RSM.

En el gráfico 7 (figura 3.14) se observa el efecto de las variables CHS y RSM sobre el rendimiento global del proceso; en él puede destacarse que el tratamiento alcalino tiene un efecto negativo pequeño sobre esta respuesta y que la carga de sulfito tiene un leve efecto positivo. El mayor rendimiento se alcanza para una RSM de 80% y 3,4% de CHS (cuando AE=0,25 FPU/ml y CS=2%).

Las otras dos variable que se han estudiado: actividad enzimática (AE) y concentración de sustrato (CS), propias de la etapa final del procesos (hidrólisis enzimática), tienen mayor significancia en las respuestas analizadas.

El gráfico 8 (figura 3.10)muestra el efecto del AE y CS sobre la conversión de los polisácaridos, esto es la fracción de polisácaridos alimentados en la etapa de hidrólisis que son hidrolizados a azúcares reductores, en él se puede ver, claramente, que a mayor actividad enzimática mayor es la conversión; por el contrario el aumento de la concentración del sustrato influye negativamente, la máxima conversión se obtuvo para una razón de sulfito de 80%, CHS 3%, CS 2 % y AE de 0,25 FPU/ml.

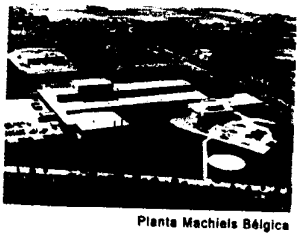
Respecto a la concentración de los azúcares reductores (CAR) se puede observar en el gráfico 9 (figura 3.12) que a una actividad enzimática dada, la CAR aumenta con la concentración del sustrato hasta un nivel en el cual la curva comienza a hacerse asintótica, evidenciando que, para cada nivel de AE, existe una conversión máxima de polisácaridos.

Por último, y como se pudiera esperar, el rendimiento de la hidrólisis aumenta, notoriamente, con el aumento de la actividad enzimática, presentando mejores resultados a bajas concentraciones de sustrato. Ver gráfico 10 (figura 3.13).

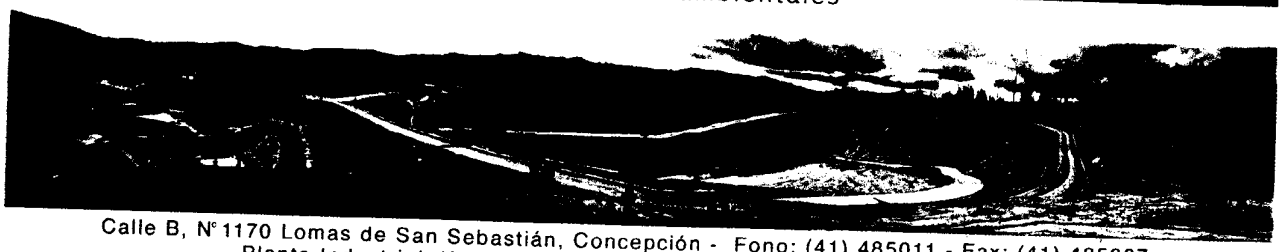
COPIULEMU

TECNOLOGIA DE PUNTA PARA LA GESTION SEGURA DE RESIDUOS

- Tratamiento y disposición de
  - Residuos sólidos industriales
  - Residuos domiciliarios
- Estación de transferencia de residuos complejos
- Recuperación y revalorización de materiales
- Instalaciones seguras que responden a los más exigentes requerimientos medioambientales



Planta Machiels Bélgica



Calle B, N° 1170 Lomas de San Sebastián, Concepción - Fono: (41) 485011 - Fax: (41) 485007
Planta Industrial: Km. 20 Camino Concepción - Cabrero - VIII Región

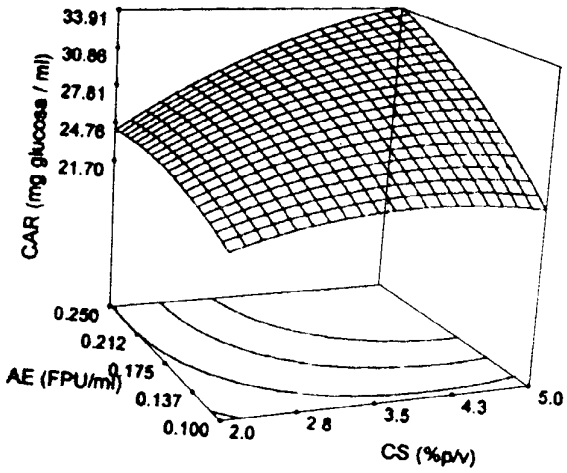


***Gráfico 9.** Concentración de azúcares reductores en la solución producto. RSM=55 % b.m.s. CHS= 5,5 % PV.*

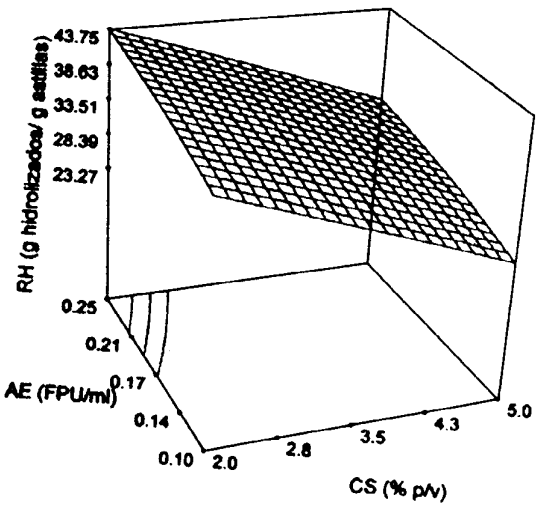


***Gráfico 10.** Rendimiento de la hidrólisis, RSM= 55% b.m.s. CHS= 5,5% P/V.*

CONCLUSIONES

- Dentro de los intervalos estudiados, las variables que más influencia tienen sobre le rendimiento global de la hidrólisis son la concentración de soda cáustica en el pretratamiento de la pulpa, la actividad enzimática y la concentración de sustrato.
- El aumento de soda en el tratamiento alcalino disminuye notablemente el rendimiento global del proceso debido a la gran pérdidad de polisacáridos en esa etapa. Por otra parte, este tratamiento favorece una mayor hidrólisis del material.
- Existe una dependencia directa entre la actividad enzimática y la concentración de sustrato. Para un nivel de actividad enzímatica dado, existe una concentración de sustrato óptima que maximiza los productos de hidrólisis.
- La deslignificación parcial con sulfito de sodio tiene un leve efecto positivo sobre el rendimiento global de la hidrólisis y sobre la conversión de polisacáridos a azúcares reductores (hidrólisis propiamente tal).
- Por último se debe destacar que mediante hidrólisis enzimática de madera deslignificada parcialmente y tratada con agentes hinchantes se puede alcanzar mayores rendimientos que mediante hidrólisis ácida convencional. En este estudio se alcanza un máximo de rendimiento de 45,7% en base a madera seca.

BIBLIOGRAFÍA

Aiba, S., Humphrey A. 1973. Biochemical Engineering. Academy Press Inc., Nueva York, EEUU. 27-30p, 224-236p.

Camacho F., González-Tello P., Jurado E. Robles A. Microcrystalline-cellulose hydrolysis with concentrated sulfuric acid. Chem. Tech. Biotechnol. 67:350-356 p (1996).

Chandía E., 1983. Prehidrólisis de madera de Eucaliptus globulus en tratamiento con ácido sulfúrico diluido. Concepción, Chile (Memoria de título)

Goldstein, I. 1981. Organic Chemical from Biomass. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida

Mansfield S. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. Biotechnology Progress, 1999, 15, 804-816.

Parajó J.C., Alonso J.L., Alonso J.L., Vásquez D. Effect of selected operational variables on the susceptibility of NaOH pretreated pine wood to enzymatic hydrolysis: a mathematical aproach. Wood Science and Technology. 1994, 28,4,297p.

Rose, A. H., 1980. Microbial Enzymes and Bioconversions. Academic Press. Londres, Inglaterra. 290-319 p.

Tao S., Enhance cellulase production in fed-batch reactor solid state fermentation of trichoderma viride SL-1. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 1997,69,429-432.

Wood, T., Bhat, M., 1988. Methods for measuring cellulase activities. En Methods in Enzymology. Academy Press Inc. 87-112p.

Wood, T, Saddler, J., 1988. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. En Methods in Enzymology. Academy Press Inc. 3.11p.