

EXPLORACIÓN DE CELULASAS NATIVAS ARGENTINAS PARA LA SACARIFICACIÓN DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS URBANOS

S. Sampaolesi^{1*}, M.V. Toledo¹, M.C.N. Saparrat², L.E. Briand¹

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas “Dr. Jorge J. Ronco”, CONICET-CIC-UNLP.

Calle 47 N 257 La Plata, 1900, Buenos Aires, Argentina.

²Cátedra de Microbiología de la Facultad de Cs. Agrarias y Forestales, UNLP. Calle 60 y 119 La Plata, 1900, Buenos Aires, Argentina.

[*sampaolesi@quimica.unlp.edu.ar](mailto:sampaolesi@quimica.unlp.edu.ar), victoriatoledo@quimica.unlp.edu.ar

Palabras claves: RESIDUOS URBANOS, BIOMASAS, LIGNOCELULOSA, HONGOS NATIVOS, ACTIVIDAD CELULOLÍTICA.

RESUMEN

Esta contribución presenta los primeros resultados del desarrollo de una metodología para el tratamiento quimio-enzimático de desechos lignocelulósicos urbanos y de la industria platense. Específicamente, se analizó la composición del bagazo de malta de cervecerías regionales, del residuo generado por la poda urbana y del aserrín de eucalipto, sauce y álamo subproducto de la construcción de cajones para hortalizas. Entre ellos, los aserrines resultaron los residuos más recalcitrantes, con contenidos de lignina de 14 y 20%, mientras que el bagazo cervecero presenta la mejor relación holocelulosa/lignina. Como parte del desarrollo se propone la obtención de cócteles enzimáticos nativos empleando hongos aislados en Misiones, su caracterización y optimización para la obtención de azúcares reductores a partir de desechos locales. En este sentido, la cepa *Corioloopsis rigida* CLPS#232 presentó los resultados más promisorios, logrando degradar los residuos leñosos ricos en lignina.

Introducción

El fuerte crecimiento de las agroindustrias en la capital bonaerense, así como la expansión urbana asociada al desarrollo económico regional, aparejan una cuantiosa generación de residuos. Aquellos desechos compuestos por biomasa lignocelulósicas son de interés para la biorrefinería, concepto que aborda los procesos fisicoquímicos y bioquímicos que logran la conversión de biomasa en productos como combustibles, polímeros, moléculas, etc.

La región platense tiene una importante producción de residuos a partir de las agroindustrias cervecera y de pequeños aserraderos. En la última década, el polo cervecero ha tenido un rápido crecimiento que conlleva el desecho de aproximadamente 62 toneladas mensuales de bagazo de malta [1], un residuo que se compone de 9-25% de celulosa, 7-28% de lignina, 17-28% de



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



polisacáridos no celulósicos y 15-48% de proteína [2]. Otra industria próspera en el polo es la de los aserraderos, que se desarrolló a partir de la cadena frutihortícola abasteciéndola de cajones de hortalizas e insumos para invernaderos. El aserrín del sauce contiene 40-44% de celulosa, 17-22% de hemicelulosa y 24-26% de lignina; mientras que el de eucaliptus reporta 48% de celulosa, 13% de hemicelulosa y 30% de lignina[3]. Estos desechos, así como el follaje que constituye el residuo de poda urbano, pueden ser materia prima de biorrefinerías.

La primera etapa de la biorrefinería es la deconstrucción de la biomasa en azúcares reductores que actuarán como *building blocks* en la síntesis de sustancias carbonadas más complejas. Luego del pre-tratamiento fisicoquímico, la celulosa y hemicelulosa obtenidas son hidrolizadas por enzimas celulolíticas, generalmente de origen fúngico. Los cócteles que contienen estas actividades enzimáticas pueden ser comerciales u obtenidos de especies nativas. Respecto de esta última alternativa, existe un potencial poco explorado en nuestros bosques que, de ser aprovechado, podría derivar en la obtención de cócteles más eficientes en su aplicación sobre biomásas nativas, mejor adaptados a las condiciones requeridas por la industria local y de menor costo, mejorando la rentabilidad de los bioprocesos. El presente trabajo aborda el análisis de la composición lignocelulósica de residuos locales platenses y la caracterización inicial de cepas fúngicas nativas respecto de su capacidad de degradarlos.

Experimental

Análisis fisicoquímico de los residuos lignocelulósicos.

Los residuos caracterizados en su composición lignocelulósica según Coronado y col. [4] fueron bagazo de malta cervecero (BMC), aserrín de eucaliptus (AE), aserrín de sauce y álamo (ASA) y residuo de poda urbana (RPU) compuesto por hojas y ramas de *Mespilus germanica*, *Tipuana tipu*, *Persea americana*, *Quercus robur* y *Jacaranda mimosifolia*.

Cada biomasa se lavó con agua, secó a 50 °C hasta peso constante para cuantificar humedad y se molió. Los extractables orgánicos se determinaron en equipo Soxhlet durante 8h con acetona (normativa estándar T 264 cm-07). A continuación, las biomásas molidas y libres de extractables orgánicos se sometieron a extracción acuosa a 100°C durante 3h; el sólido recuperado se secó a 100°C y se pesó en balanza analítica. El contenido de celulosa y hemicelulosa (holocelulosa) se obtuvo gravimétricamente por deslignificación de las biomásas tratando con ácido acético y clorito desodio a 75°C durante 5h. A partir de la holocelulosa se determinó gravimétricamente el contenido de celulosa por tratamiento con NaOH 17,5% p/V durante 100 min a 20°C. El sólido recuperado se lavó con ácido acético 10,0% V/V y agua destilada hasta alcanzar pH neutro, se secó a 100°C y pesó. El contenido de hemicelulosa se determinó como la diferencia entre las fracciones de holocelulosa y celulosa. Finalmente, el contenido de lignina Klason se determinó tratando las biomásas molidas y libres de extractables orgánicos con ácido sulfúrico 3,0% V/V a 100°C durante 4h. El sólido obtenido se lavó con

agua destilada hasta pH neutro, se secó y pesó.

Cepas fúngicas y caracterización de su capacidad celulolítica sobre residuos biomásicos.

Se utilizaron hongos autóctonos aislados de la selva de Misiones, Argentina, pertenecientes al Cepario del Instituto Spegazzini, UNLP: *Corioloopsis rigida* CLPS#232 y *Ulocladiumbotrytis* CLPS#813. Estos se cultivaron en agar extracto de malta (extracto de malta 30,0 g/L, peptona de soja 3,0 g/L, agar agar 15,0 g/L) durante 7 días a 30°C para obtener pre-inóculos.

Posteriormente, las cepas se cultivaron en medios diseñados con los residuos BMC, AE, ASA y RPU como fuente de carbono [5]. Los hongos se sembraron desde los pre-inóculos en medio mínimo salino (MM) suplementado con 5,0 g/L de los residuos secos y molidos o estándar carboximetilcelulosa (CMC), 15,0 g/L de agar agar y azul de tripán. Las placas de MM-sustrato se incubaron durante 14 días a 30°C para determinar la capacidad de las cepas de crecer en cada sustrato y detectar la presencia de un halo incoloro alrededor del micelio, asociado a la degradación de la biomasa teñida con azul de tripán.

Resultados y discusión

La Tabla 1 presenta los resultados del análisis composicional de los residuos. Respecto al contenido de holocelulosa, compuesta de azúcares reductores plausibles de ser reutilizados, las biomásas leñosas AE y ASA presentan el mayor contenido, seguidas del residuo de poda. Sin embargo, dichos azúcares serán difíciles de recuperar, dado que AE y ASA tienen elevados contenidos de lignina que aumentan su recalcitrancia a la deconstrucción y sacarificación. Si se considera la porción libre de humedad del BMC, la relación holocelulosa/lignina resulta la más promisoriosa a los fines de obtener azúcares reductores con el menor esfuerzo de pre-tratamiento.

Tabla 1. Composición porcentual de los residuos lignocelulósicos analizados.




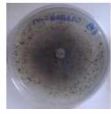
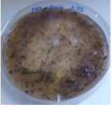

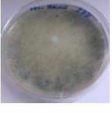

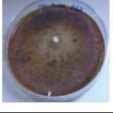

Biomasa	% Hum	% EO	% EA	% Lig	% Holo	% Cel	% Hemi
BMC	74.2± 0.4	1.24±0.01	9.2 ± 0.1	4.6 ± 0.5	14 ± 1	7.2 ± 0.5	6.8
AE	13.8± 0.8	0.36±0.04	15 ± 1	20 ± 1	54 ± 4	44.6± 0.7	9.4
ASA	51.0± 3.0	0.23±0.03	6.4 ± 0.8	14 ± 2	36 ± 2	27.7± 0.1	8.3
RPU	48.0± 3.0	1.8 ± 0.1	19.4± 0.4	10 ± 3	20 ± 2	14	6

% Contenido porcentual de: Hum (humedad), EO (Extractables orgánicos), EA (Extractables acuosos), Lig (lignina), Holo (holocelulosa), Cel (celulosa) y Hemi (hemicelulosa). Se informa el promedio de los triplicados de cada determinación ± su desviación estándar.

A continuación, se inició el estudio de cepas fúngicas nativas respecto de sus capacidades

de crecer y secretar enzimas que degraden las biomasas residuales caracterizadas en la primera etapa. La Tabla 2 muestra los resultados de cada cepa en MM-sustrato-azul de tripán.

Tabla 2. Caracterización de la capacidad celulolítica de hongos nativos sobre residuos.

Residuo/sustrato	<i>C. rigida</i> CLPS#232	<i>U. botrytis</i> CLPS#813	
CMC	 +++	 +	Ambas cepas fueron capaces de crecer en los sustratos propuestos. Sin embargo, sólo en algunos de ellos desarrollaron un halo de celulólisis (+). La cepa <i>U. botrytis</i> CLPS#813, aislada de hojarasca de suelo, creció prominentemente en CMC, BMC y RPU. Su desarrollo fue menor en los residuos con mayor contenido de
BMC	 -	 -	
AE	 +++	 -	
ASA	 +++	 -	
RPU	 ++	 -	

lignina, como ASA y AE. Un claro halo pudo verificarse en placas de MM-CMC (Tabla 2). *C. rigida* CLPS#232, aislada de árboles en descomposición, creció en todos los sustratos y desarrolló halos de degradación en CMC, ASA y AE, incluso un pequeño halo en RPU.

Conclusiones

El BMC es un residuo abundante en la región, rico en holocelulosa y con bajo contenido de lignina aprovechable en biorefinería. Ambos hongos nativos pudieron crecer en BMC y se profundizará su caracterización como agentes degradadores. *C. rigida* CLPS#232 tuvo los resultados más promisorios para la obtención de cócteles enzimáticos capaces de sacarificar las biomasas más recalcitrantes.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación a través de los proyectos PUE005 y PIBAA0040.

Referencias

- [1] L. Pagnutti y H.M. Lázaro en Fortalecimiento de Agroindustrias Cerveceras PyMES en AMBA (2016).
- [2] S.I. Mussatto, G. Dragone, I.C. Roberto; J. Cereal Sci. 43 (2006) 1-14.
- [3] S. Sampaolesi, L.E. Briand, M.C.N. Saparrat, M.V. Toledo; Sustainability 15(10) (2023): 8343.
- [4] M. A. Coronado, G. Montero, D. G. Montes, B. Valdez-Salas, et al.; Sustainability, 12 (2020) 7744.
- [5] N. Romano, A. Gioffré, S.M. Sede, et al.; Current Microbiol., 67 (2013) 138-147.