

## **Degradación de películas de celulosa residual usando celulasas de *Trichoderma reesei* ATCC 26921**

Gonzalo Cárdenas, Pedro Vázquez, Guillermo Arzate, Lorenzo Jarquín y Oscar Portilla

G. Cárdenas, P. Vázquez, G. Arzate, L. Jarquín y O. Portilla  
Universidad Politécnica de Guanajuato. Ingeniería Agroindustrial. Avenida Universidad Norte Sin Número, Comunidad Juan Alonso, Cortazar Guanajuato. CP. 38483.  
CICATA-Querétaro. Cerro Blanco No. 141. Col. Colinas del Cimatarío, C.P. 76090. Querétaro, Querétaro MÉXICO  
oportilla@upgto.edu.mx

M. Ramos., V. Aguilera., (eds.) .Ciencias de la Ingeniería y Tecnología, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2014.

## Abstract

In Mexico, huge amounts of residual cellulose from meat industry are generated. This figure represents an economic problem for the industry and an ecological problem in the environment as cellulose wastes are disposed in landfills where it take long time for degradation. For that reason, it is necessary to propose alternatives for taking advantage of this waste in two directions, the first is to reduce the amount of waste disposed and the second is to generate products whit economic value. In this work trails were performed to find the kinetic parameters of the enzymatic degradation using cellulases from *Trichoderma reesei* ATCC 26921. It was found that when using 46.6 U/g of cellulose it is reached 100 % of degradation of cellulose films at 24 h. The kinetic study showed a  $V_{max}$  of 5.57 g/L h<sup>-1</sup> and a  $K_m$  of 76 g/L. With this parameters it is possible to predict the glucose concentrations reached when using different substrate concentrations.

## 5 Introducción

Se calcula que en México, se generan grandes cantidades de película celulósica mensuales, las cuales como se ha mencionado son vertidas en rellenos sanitarios sin ningún tratamiento, por lo que después de destaparlos se observa que la película celulósica está prácticamente intacta. Esto ocasiona que se generen microorganismos inoocuos y patógenos debido a la presencia de jugo residual de la carne con sal, nitratos y nitritos (Gentry et al. 1996).

Diversas industrias alimentarias generan miles de toneladas de desechos en sus procesos de producción. Una de ella es la empresa de embutidos, donde se desechan residuos de carne, grasa, plásticos y envoltura de cocimiento, esta última llamada película de celulosa.

La película de celulosa es una materia prima permeable diseñada para el cocimiento con vapor de embutidos como son la salchicha, el producto está diseñado para el manejo de alimentos por lo cual no cuentan con ingredientes tóxicos. La resistencia del material hace de lenta integración al medio ambiente. Este material se extrae como celulosa a partir de árboles de pino y maple, la cual es pasada por un proceso a través de químicos con el fin de cambiar su composición física y dar la propiedad de un material firme, flexible y altamente resistente (Nicholson, 2006).

Sreenath y Koegel (2008), utilizaron celulosa proveniente de la película de cocción de las salchichas para la producción de celulasas. Posteriormente el sustrato rico en enzimas producidos por la degradación del hongo *Trichoderma reesei* se mezcló directamente con películas de celulosa para la producción de altos rendimiento de ácidos lácticos o etanol mediante la sacarificación y fermentación con ayuda de bacterias lácticas. Por otro lado Viikari et al. (1998) proponen un método de degradación enzimática de la película de celulosa utilizando enzimas comerciales. Donde se pone la película de celulosa en un biorreactor junto con enzimas comerciales y estas al degradar la película se genera un jarabe de glucosa. Cumba y Bellmer 2010 investigaron la facilidad de la producción de glucosa por hidrólisis enzimática usando celulasa comerciales. En el estudio se demuestra que 6 enzimas probadas la más eficiente muestran una degradación de más del 80% después de 24 h a 50°C con una carga de 20 FPU/g.

Como se puede observar son poco los estudios que se tienen relacionados con el uso que se le da a la película de celulosas, en cambio en ninguno nos muestra los parámetros cinéticos en la utilización de enzimas comerciales. En el presente trabajo se realizaron pruebas para encontrar los parámetros cinéticos ( $V_{max}$ ) y  $K_m$ ) para la degradación de las películas de celulosa residual mediante una celulasa comercial obtenida de *Trichoderma reesei*.

## 5.1 Materiales y métodos

Preparación de películas de celulosa. La película de celulosa viene entera y con cierta humedad de ~ 75 %. Como primer paso se puso a secar a 35 °C durante 48 horas. Después fue sometida a reducción de tamaño hasta alcanzar 4 mm.

### Estudio de los parámetros cinéticos $V_{max}$ y $K_m$

Para el experimento de la degradación enzimática se utilizó la enzima comercial Cellulase obtenida de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 de la marca Sigma-Aldrich. La presentación comercial indica  $\geq 700$  unidades/gramo

Para encontrar los parámetros cinéticos se realizaron las pruebas que se mencionan a continuación:

### Estudio para encontrar la dilución de enzima

Del frasco de la enzima se hicieron diluciones de la misma usando como solvente Buffer citrato de sodio 0.05 M pH 8. Las diluciones fueron 22.16 U/g, 21 u/g, 19.8 u/g, 18.6 u/g, 17.5 u/g, 16.3 u/g, 12.8 u/g, 9.3 u/g, 5.8 U/g y 2.3 u/g de enzima correspondientemente.

Con cada una de las diluciones se hizo la prueba de actividad enzimática. La determinación de azúcares se hizo mediante HPLC a la hora de reacción.

Paralelamente se utilizaron soluciones de enzima con mayor concentración: 46.6 U/g y 23.3 U/g de enzima en forma correspondiente. A estas nuevas diluciones se les hizo la prueba de actividad enzimática utilizando tanto papel filtro como la película de celulosa. La determinación de azúcares se hizo mediante HPLC a las 24 horas de reacción.

### Cinética para estudiar los parámetros $K_M$ $V_{Max}$

Para la elaboración de la curva de calibración se utilizó una concentración fija de 140 u/g de enzima comercial cambiando la concentración de sustrato, que para esta prueba fue película de celulosa, dichas concentraciones de sustratos fueron 0.03, 0.09, 0.15, 0.21 y 0.27 g de celulosa.

A las muestras se les hizo la prueba de actividad enzimática durante 26 h, sacando una muestra de cada sustrato a la 0, 4, 8, 12, 16 y 26 horas de reacción, cada que se sacaba la muestra se metía a refrigeración con el fin de detener la reacción. La determinación de azúcares se hizo mediante HPLC.

### Determinación de azúcares por HPLC

La determinación de azúcares, en éste caso glucosa producida debido a la degradación de la reacción enzimática, fue analizada en el Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA) Unidad de Querétaro, Ubicado en la ciudad de Querétaro, Qro.

Para la cuantificación de glucosa se utilizó un cromatógrafo de líquidos, el cual fue un HPLC Agilent Technologies 1200 Series.

Para la fase estacionaria se utilizó una columna aminada de 150mm; como fase móvil se usó una solución de acetonitrilo al 80%, el 20 % restante fue de agua destilada. El método de detección utilizado fue por índice de refracción.

#### Determinación de azúcares por el método de DNS

Para la determinación de glucosa se utilizó una técnica colorimétrica, utilizando un Espectrofotómetro UV/Vis Optizen Pop marca Mecasys. La técnica utilizada se realizó tal y como lo establece la Unión Internacional de Química Pura y (IUPAC.1987) ver anexo 2.

#### Determinación % de degradación películas de celulosa.

Para determinar el peso seco de la película, esto con el fin de saber qué cantidad de película se degradó se usó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de degradación} = \frac{(P_1 - P_2)}{P_1} \times 100 \quad (5)$$

Donde:

P1= peso inicial de película de celulosa

P2 = peso final película de celulosa.

#### Análisis de Datos

Todos las pruebas fueron realizadas con al menos una réplica y los resultados mostrados son los promedios de dichas réplicas. Los análisis estadísticos se hicieron utilizando el software de Microsoft Excel 2013.

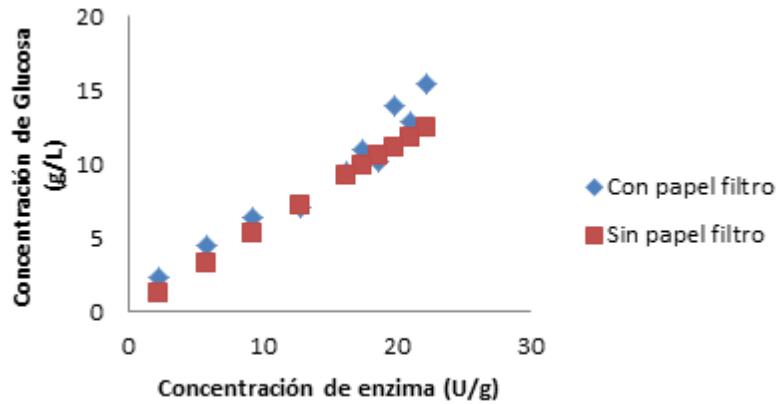
## 5.2 Resultados y discusión

Para la degradación enzimática primero se hizo un análisis para conocer concentración de enzimas a utilizar.

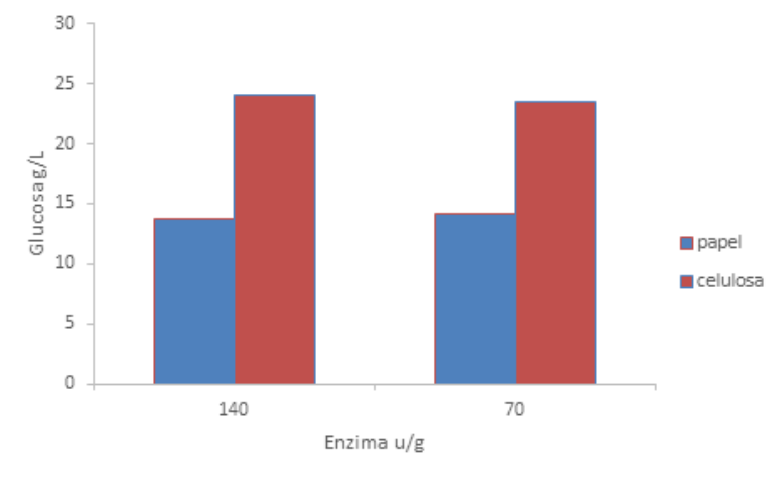
Los resultados de 10 diluciones utilizadas se muestran en la Figura 1, donde se observa que tanto las muestras como los blancos contienen prácticamente la misma cantidad de glucosa por lo que optó por usar concentraciones más altas de enzima y dejar la reacción por 24 h.

Las Figuras 2 y 3 muestran los resultados obtenidos al utilizar 23.3 y 46.6 U/g. Considerando esta información, los estudios subsecuentes se realizaron utilizando 46.6 U/g de enzima ya que ésta es la que muestra un porcentaje mayor de degradación en la película de celulosa.

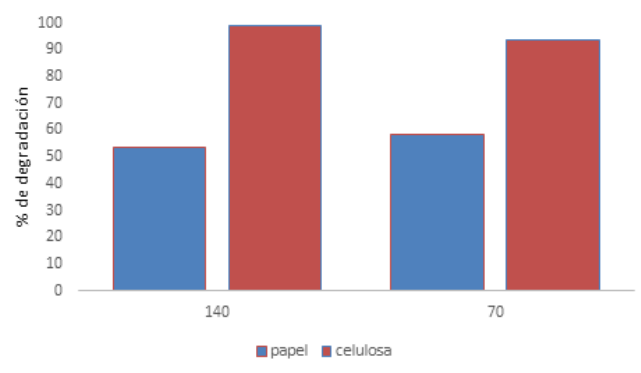
**Grafico 5** Concentración de glucosa reportada por HPLC en muestras de papel utilizando 10 diluciones de enzima comercial donde se muestra que a la hora de reacción se presenta aproximadamente la misma cantidad de glucosa en blancos y muestras



**Grafico 5.1** lucosa obtenida al degradar papel y película de celulosa, al usar dos concentraciones de enzima



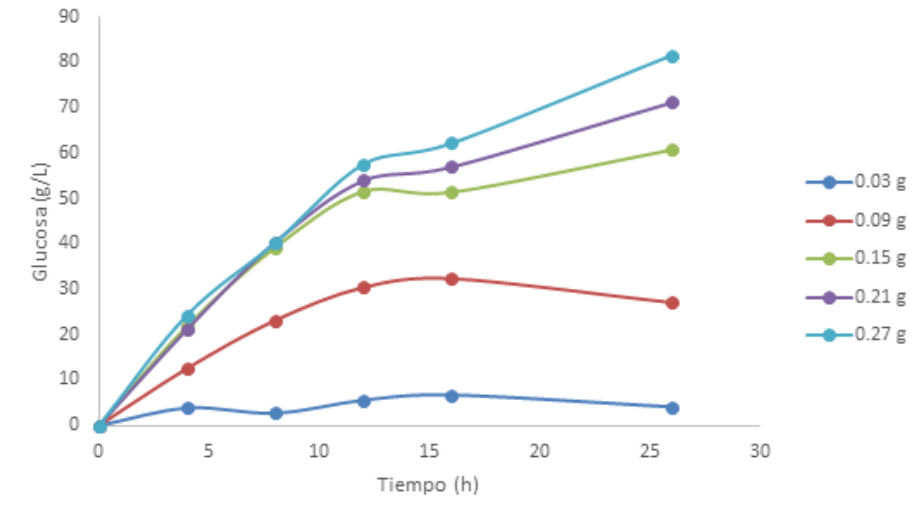
**Grafico 5.2** Porcentaje de degradación de papel y película de celulosa, al usar dos concentraciones de enzima



Cinética de degradación

Al tener la cantidad de enzima a usar se hizo la cinética de degradación enzimática que se muestra en la Figura 4. Donde se observa que a mayor concentración de sustrato hay una mayor actividad enzimática hasta alcanzar una velocidad constante.

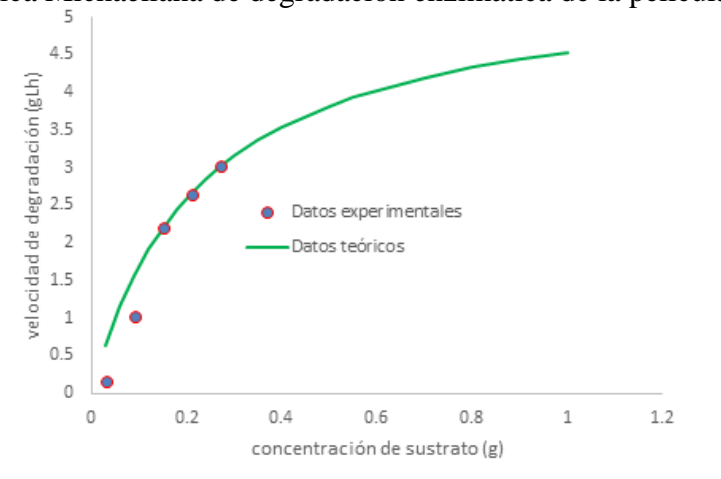
**Grafico 5.3** Cinética de degradación de película de celulosa utilizando 46.6 U/g de enzima comercial

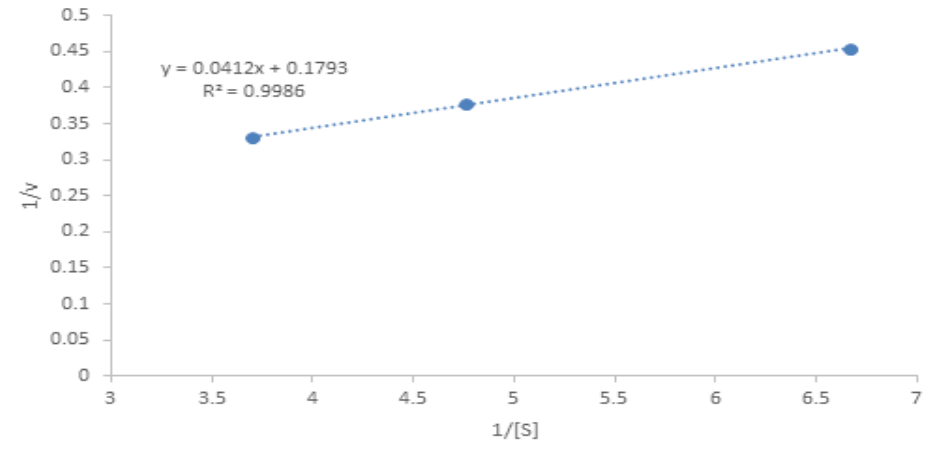


Tomando esta curva se calcularon las pendientes considerando hasta las 12 h ya que en ese tiempo se observa mayor linealidad. Con dichas pendientes se construye la cinética de Michaelis así como su recíproca, la de Lineweaver – Burk, las cuales se muestran en las Figuras 5 y 6 respectivamente. Considerando el doble recíproco se calcula la  $V_{max}$  y la  $K_m$ , donde la  $V_{max}$  arroja un resultado de  $5.57 \text{ g/L h}^{-1}$ , mientras que la  $K_m$  arroja un resultado de  $76 \text{ g/L}$ . Con estos valores se aplica la ecuación (1) para sacar los valores teóricos y se grafican en la misma grafica de Michaelis y se observa que el modelo teórico con el experimental se corresponden.

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (5.1)$$

**Grafico 5.4** Cinética Michaeliana de degradación enzimática de la película de celulosa



**Gráfico 5.51** Gráfico de dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk

Cumba y Bellmer (2010) reportan resultados de la degradación de películas de celulosa utilizando 6 enzimas comerciales teniendo como resultados que una de esas seis enzimas es capaz de degradar por arriba del 80% a las películas de celulosa después de 24h a 50°C mostrando una actividad de 20 UIPF (Unidades internacionales de Papel Filtro) g<sup>-1</sup> de películas. Además, Sreenath y Koegel (2008) reportan valores sobre el 90 % de degradación con una enzima producida en fermentaciones en medios usando celulosas como sustrato. Los resultados mostrados en este trabajo mejoran los obtenidos en la bibliografía ya que se logra degradar 98.8 % de la película y convertirla en glucosa, alcanzándose 24 g/L de glucosa en el medio de reacción.

### 5.3 Conclusiones

Los parámetros cinéticos indican que al utilizar 76 g/L de película de celulosa como sustrato en la degradación química se obtiene la mitad de la velocidad máxima que corresponde con 5.5 g/L h<sup>-1</sup>. Además, al utilizar 46.6 U/g de la enzima comercial es posible degradar 98.8 % de la película de celulosa residual en 24 h a una temperatura de 50°C.

### 5.4 Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por PROMEP mediante el proyecto al Fortalecimiento al Cuerpo Académico Ciencia y Tecnología Agroindustrial. Oficio: PROMEP./103.5/11/694.

### 5.5 Referencias

Gentry JL, Hussein HS, Berger LL, Fahey Jr GC. Spent cellulose casings as potential feed ingredients for ruminants. *J Anim Sci* 1996; 74:663–71.

Nicholson, M. D. 2006. Recycling cellulosic casing. European patent office EP- 0692194-B2. Boletín 42.

Sreenath HK and Koegel RG. (2008) Bioconversion of spent cellulose sausage casings. *Enzyme and Microbial Technology*. 43,226-232.

Viikari L, Mustranta A, Ojamo O, Itavaara M, Johansson T. Method of dissolution of sausage skins and other cellulosic substances by means of enzyme solution. US Patent 5, 814,515 (September 29, 1998).

Cumba HJ, Bellmer D. Production of value-added products from meat processing cellulosic waste. In: Proceedings of American Society of Agricultural Engineers Annual International Meeting, Paper 057032. 2005.