

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
AGROINDUSTRIA**

**OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CON ACTIVIDAD
CELULOLÍTICA MEDIANTE FERMENTACIÓN DEL HONGO
Trichoderma reesei SOBRE CELULOSA Y POSIBLE
APLICACIÓN EN EL BIO-PULPEO DE ENVASES MULTICAPA**

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
AGROINDUSTRIAL**

ALEXANDRA MARIELA GUEVARA TOPÓN
alexandra.guevara@epn.edu.ec

DIRECTORA: MARY FERNANDA CASA VILLEGAS, PhD.
mary.casa@epn.edu.ec

Quito, abril 2020

© Escuela Politécnica Nacional (2020)
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo Alexandra Mariela Guevara Topón, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Alexandra Mariela Guevara Topón

CERTIFICACIÓN

Certificamos que el presente trabajo fue desarrollado por Alexandra Mariela Guevara Topón, bajo mi supervisión.

Mary Fernanda Casa Villegas, PhD.
DIRECTOR DE PROYECTO

AUSPICIO

La presente investigación contó con el auspicio financiero del Proyecto PII-DECAB-2019-02: “Estrategias para la generación de extractos enzimáticos con actividad celulolítica”, de la Escuela Politécnica Nacional (EPN) que se ejecuta en el Departamento de Ciencias de Alimentos y Biotecnología (DECAB).

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de mi proyecto de investigación, la Dra. Mary Casa Villegas, gracias por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio, por compartirme sus conocimientos y por enseñarme a creer en mí.

A mis padres, por ser el motor de mi vida, por acompañarme en las buenas y en las malas y luchar conmigo en los momentos más difíciles de mi vida.

A la Dra. Andrea Papenbrok, por todo el apoyo que me ha dado durante mi lucha con mi enfermedad, por ser una amiga y una madre para mí.

A todos los ingenieros de la Escuela Politécnica Nacional, por haberme compartido sus conocimientos a lo largo de mi preparación profesional y a mis amigos, con quienes he compartido momentos inolvidables. A todos los llevo en mi corazón.

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mis padres, a Andrea y a la Dra. Mary Casa, quienes son los personajes principales de la historia de mi vida y que gracias a su apoyo incondicional logré culminar una etapa importante de mi historia.

En honor a la memoria de Esteban Roberto Llamatumbi y mi amigo fiel Locky.

Obtención de extractos enzimáticos con actividad celulolítica mediante fermentación del hongo *Trichoderma reesei* sobre celulosa y posible aplicación en el bio-pulpeo de envases multicapa

Resumen: Las celulasas son glicosil hidrolasas especializadas en catalizar la descomposición de celulosa. Estas enzimas tienen múltiples aplicaciones en varias industrias como la textil, alimentaria, bioenergética, entre otras. Las celulasas pueden ser de origen bacteriano o fúngico; estas últimas, particularmente las producidas por el hongo *Trichoderma reesei* en varios sistemas fermentativos, son las más destacadas por la capacidad celulolítica que poseen. En este trabajo se estudiaron dos sistemas de fermentación, uno líquido (SFL) y otro sólido (SFS), para la producción de extractos enzimáticos con actividad celulolítica utilizando *T. reesei* y dos fuentes de celulosa como sustrato, papel filtro y cartón dúplex, cortados en dos tamaños, 0,25 cm² y 1,00 cm². El extracto enzimático obtenido del SFS con papel filtro de 0,25 cm², alcanzó la mayor actividad celulolítica (1,15 FPU/mL). Adicionalmente, en este trabajo se estudiaron dos posibles opciones biotecnológicas para eliminar la celulosa contenida en los envases multicapa reciclados basados en la acción celulolítica de *T. reesei*. Como primera opción, los extractos enzimáticos con mayor actividad celulolítica fueron utilizados para remover la celulosa (bio-pulpeo) de los envases multicapa. Después de 48 h a 50 °C y 200 rpm, la remoción de la celulosa fue parcial. Esta opción de bio-pulpeo se comparó con la acción directa de *T. reesei* sobre la celulosa contenida en los envases multicapa, en condiciones de fermentación líquida. Después de 7 días de fermentación a 30 °C y 200 rpm, toda la capa de celulosa fue removida y liberada al medio de cultivo, por lo que resultó ser ésta, la opción más eficaz para el bio-pulpeo.

Palabras clave: Extractos enzimáticos, celulosa, celulasas, bio-pulpeo, *Trichoderma reesei*, envases multicapa.

Obtaining enzyme extracts with cellulolytic activity by fermentation of the *Trichoderma reesei* fungi on cellulose and possible application in the bio-pulping of multilayer containers

Abstract: Cellulases are glycosyl hydrolases specialized in catalyzing the breakdown cellulose. These enzymes have multiple applications in several industries such as textiles, food, bioenergetics and others. Cellulases can be of bacterial or fungal origin, the latter, particularly those produced by the fungi *Trichoderma reesei* in different fermentative systems, are the most prominent due to the cellulolytic capacity they possess. In this research, two fermentation systems, liquid (SLF) and solid (SSF), were studied for the production of enzyme extracts with cellulolytic activity using *T. reesei* and two sources of cellulose as substrate, filter paper and duplex cardboard, cut in two sizes, 0,25 cm² and 1,00 cm². The enzyme extract obtained from the SSF with filter paper (0,25 cm²), reached the highest cellulolytic activity (1,15 FPU/mL). Additionally, in this study, two possible biotechnological options to remove the cellulose contained in the recycled multilayer containers based on cellulolytic action of *T. reesei* was studied. As a first option, enzyme extracts with the highest cellulolytic activity were used to remove the cellulose (bio-pulping) from multilayer containers. After 48 h at 50 °C and 200 rpm, cellulose removal was partial. This bio-pulping option was compared with liquid fermentations of *T. reesei* directly on recycled packages were carried out. After 7 days of fermentation at 30 °C and 200 rpm, the whole cellulose layer from multi-material paper-based packages was removed, proving to be the most effective option for the bio-pulping.

Keywords: Enzymatic extracts, cellulose, cellulases, bio-pulping, *Trichoderma reesei*, multilayer packaging

1. INTRODUCCIÓN

La celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza (Mohite y Patil, 2016); es el principal componente estructural de la pared vegetal de las plantas (Rudin y Choi, 2013), es una estructura cristalina difícil de hidrolizar, compuesta por moléculas de glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos $\beta(1\rightarrow4)$ (Bajpai, 2017). La celulosa se puede degradar mediante hidrólisis enzimática con celulasas (Gutiérrez-Rojas, Moreno-Sarmiento y Montoya, 2015).

Las celulasas son glicosil hidrolasas que catalizan la ruptura del enlace glucosídico $\beta(1\rightarrow4)$ entre dos glucosas (Martínez-Anaya, Balcázar-López, Dantán-González y Folch-Mallol, 2008); están formadas por tres grupos de enzimas: endoglucanasas (EC 3.2.1.4), que actúan de forma aleatoria sobre las cadenas de celulosa amorfa o cristalina; celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91), que cortan por los extremos de las cadenas de celulosa y liberan celobiosa; y β -glucosidasas (EC 3.2.1.21), que degradan a la celobiosa en glucosa (Deswal, Khasa y Kuhad, 2011).

Las celulasas son producidas por varios microorganismos, comúnmente por bacterias y hongos (Gutiérrez-Rojas et al., 2015). Las celulasas de origen fúngico son la más utilizadas debido al poder celulolítico de sus enzimas (Panchapakesan y Shankar, 2016).

Los hongos filamentosos pertenecientes al Phylum *Ascomycota* se destacan por ser grandes productores de enzimas celulolíticas (Bansal, Tewari, Soni y Soni 2012). *T. reesei* es un ascomiceto metabólicamente versátil, conocido por ser un microorganismo celulolítico por excelencia (Gusakov, 2011); es una de las especies más utilizadas en la producción de enzimas a nivel industrial, capaz de descomponer una gran variedad de sustratos celulósicos (Hernández-Melchor, Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2019; Sandle, 2014).

El extracto enzimático de *T. reesei* está compuesto por 4 endoglucanasas, 2 celobiohidrolasas y 1 β -glucosidasa (Rosgaard et al., 2007) que actúan sinérgicamente en la hidrólisis de celulosa (Casa-Villegas, Marín-Navarro y Polaina, 2017). Pese a que en el genoma de *T. reesei* se han identificado diez genes que codifican β -glucosidasas, cinco extracelulares y cinco intracelulares (Guo et al., 2016; Treebupachatsakul et al., 2016), solo una denominada BGL1 o Cel3A es liberada al medio de cultivo y forma parte del extracto enzimático (Karkehabadi et al., 2014). El aporte de esta enzima en el extracto celulolítico es de tan solo el 1-2 % y su elevada sensibilidad a la inhibición por glucosa, con una K_i de 0,5 mM (Woodward y Arnold, 1981; Xiao, Zhang, Gregg y Saddler, 2004), conlleva a la acumulación de celobiosa en el medio de cultivo, la cual a su vez inhibe a las celobiohidrolasas (K_i de 1,5 mM (Gruno, Våljamäe, Pettersson y Johansson, 2004)) y endoglucanasas, que limita la hidrólisis de celulosa (Karkehabadi et al., 2014).

Para generar extractos enzimáticos con alta actividad celulolítica varios factores tienen un rol importante como: el tipo de cepa, la disponibilidad de nutrientes, el tipo y tamaño de sustrato, las condiciones de cultivo y el tipo de fermentación (Callow, Ray, Kelbly y Ju, 2015; Centeno y Pavone, 2015; Dashtban, Buchkowski y Qin, 2011; Singhania et al., 2010). Existen estudios que se han enfocado en la producción de extractos celulolíticos de *T. reesei* con diferentes sustratos y medios de fermentación como paja de arroz, celulosa en polvo y una mezcla de celulosa y hemicelulosa en fermentaciones sumergidas (Colina, Ferrer y Urribarrí, 2009), papel bond y aserrín en medios sólidos (Zapata, Galviz-Quezada y Osorio-Echeverri, 2018) y papel filtro en medio líquido o sólido (Casa-Villegas et al., 2017).

Las celulasas de *T. reesei* juegan un papel crucial como biocatalizadores (Druzhinina y Kubicek, 2017). Estas enzimas tienen aplicaciones importantes dentro de varios sectores industriales (Cherry y Fidantsef, 2003), han proporcionado nuevas alternativas biotecnológicas que reemplazan a los procesos convencionales y así mejorar la calidad del producto, reducir costos y optimizar los recursos (Sarrouh et al., 2012). Las principales industrias que emplean

celulasas de *T. reesei* son la energética, textil, de alimentos, farmacéutica, de detergentes y de pulpa y papel (Li et al., 2012).

La industria de pulpa y papel es una de las industrias más grandes a nivel mundial (Bajpai, 2014). Varios productos se derivan de esta industria como papel para imprenta y escritura, papel para uso doméstico e industrial, papel suave higiénico (*tissue*) y cartón para empaques de alimentos y envases multicapa de cartón comúnmente conocidos como Tetra Pak® (Jayasekara y Ratnayake, 2019; Berg y Lingqvist, 2019). El incremento en la demanda de estos productos ha ocasionado una mayor generación de residuos sólidos, los mismos que contribuyen a la contaminación ambiental (Gopal, Sivaram y Barik, 2019). Una manera de controlar la generación de residuos es a través del reciclaje (Pivnenko, Eriksson y Astrup, 2014).

Los envases multicapa de cartón se componen de seis capas, formadas a partir de tres materiales: celulosa (75 %), polietileno de baja densidad (20 %) y aluminio (5 %) (Salamanca y Vaca, 2017), donde la celulosa se encuentra entre la lámina de polietileno aluminio (PE-Al) y la capa externa de polietileno. La celulosa que forma parte de los envases multicapa tiene un bajo grado de cristalinidad en comparación con otros materiales como el papel filtro (Zhang y Lynd, 2004), y proviene de fibras de madera virgen de pino procedentes de bosques certificados FCS® y otras fuentes controladas (Tetra Pak®, 2019; Turrado, Dávalos, Fuentes y Saucedo, 2012).

Los envases Tetra Pak® tienen especial interés en el reciclaje por la presencia de aluminio en una de sus capas. Para su recuperación es necesario remover la capa de cartón del envase (Martínez-López, Martínez-Barrera, Barrera-Díaz y Ureña-Nuñez, 2015). Los métodos actuales de remoción son físico-químicos, no siempre amigables con el medio ambiente y por lo general altamente demandantes de agua (Zawadiak, Wojciechowski, Piotrowski y Krypa, 2017), energía (Hidalgo-Salazar, Luiz Nieves y Baena, 2013) e insumos químicos (Karaboyaci, Gizem, Kilic y Sencan, 2017; Turrado et al., 2012).

En este sentido, el objetivo de este trabajo fue la obtención de extractos enzimáticos con actividad celulolítica mediante fermentación del hongo *T. reesei* sobre celulosa y el planteamiento del bio-pulpeo de envases reciclados de Tetra Pak® por medio de la acción celulolítica de *T. reesei*.

2. METODOLOGÍA

2.1. Microorganismo, sustratos y medios de cultivo

Se empleó el hongo *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) CECT 2415, donado por el Laboratorio de Ingeniería Molecular de Enzimas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de España. Esporas de *T. reesei* fueron obtenidas mediante el cultivo del hongo en medio agar papa dextrosa de Difco™ a 30 °C en una estufa

BOEKEL-132000 (USA), se recogieron en agua estéril y se conservaron a 4 °C. La concentración de esporas se determinó mediante conteo en una cámara Neubauer.

Los sustratos utilizados fueron: papel filtro (85 g/m², MACHEREY-NAGEL®, Alemania), cartón dúplex (315 g/m²) y envases multicapa de cartón reciclados. Los envases reciclados de Tetra Pak® se recogieron de residuos domésticos. Cada material fue cortado en cuadrados de 0,25 cm² y 1,00 cm², para los respectivos ensayos.

Los medios líquidos de cultivo usados fueron: YP (extracto de levadura 1 %, peptona 2 % de Bacto™, almidón 0,5 % de Baker Analyzed), YP2F (YP, papel filtro 2 %) y YP5C (YP, celulosa 5 % proveniente de papel filtro o cartón dúplex).

2.2. Obtención de los extractos enzimáticos celulolíticos

Preparación de inóculos

Se inocularon 2 mL de medio YP2F estéril con 10 µL de una suspensión de esporas de *T. reesei* de orden 10⁸ esporas/mL y se colocaron en una incubadora con agitación orbital HYSC-SI 64 150 (Corea) a 30 °C y 200 rpm por 72 h (Casa-Villegas et al., 2017). Este pre cultivo fue utilizado para inocular las fermentaciones líquidas o sólidas.

Sistema de fermentación líquido

Para el sistema de fermentación líquido (SFL), en 25 mL de medio YP5C estéril se colocaron 2 mL de inóculo. El SFL se realizó en una incubadora con agitación orbital a 30 °C y 200 rpm durante distintos tiempos (2 - 9 días). El sobrenadante de los cultivos obtenidos por centrifugación, en una centrífuga Thermo Electron-HNS II (USA) a 1 500 g por 15 min, fue utilizado como extracto celulolítico.

Sistema de fermentación sólido

Para el sistema de fermentación sólido (SFS), 5 g de celulosa (papel filtro o cartón dúplex) estéril, dispuesta en matraces de 250 mL, fue inoculada con 2 mL de inóculo y humedecida con 8 mL de medio YP estéril. Los matraces fueron colocados en una estufa MMM (Medcenter Einrichtungen GmbH)-Ecocell 111(Alemania) a 30 °C durante distintos tiempos (4 - 14 días). Las enzimas generadas se extrajeron añadiendo al medio sólido fermentado, 10 mL de una solución tampón acetato de sodio 50 mM, pH 4,8 y 200 rpm por 30 min. Luego de la agitación, las partículas sólidas se removieron con un filtro con tamaño de poro de 1 mm y se centrifugó a 1 500 g por 15 min. El sobrenadante se utilizó como extracto celulolítico.

2.3. Determinación de la actividad celulolítica

La actividad celulolítica de los extractos enzimáticos obtenidos, se consiguió al cuantificar los azúcares reductores generados por la hidrólisis de una cantidad conocida de papel filtro con el método descrito por Zhang, Hong y Ye. (2009) modificado. El ensayo consistió en incubar a 50 °C, 16 mg de

papel filtro con 500 µL de diferentes diluciones del extracto enzimático en tampón acetato de sodio 50 mM, pH 4,8. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron a cada muestra 250 µL de una solución de ácido dinitrosalicílico (Ávila, Rivas, Hernández y Chirinos, 2012) (DNS, pureza ≥ 99 %) de Sigma-Aldrich® y la reacción se detuvo al hervir las muestras por 15 min. La absorbancia del sobrenadante diluido 10 veces se leyó en un espectrofotómetro Thermo Scientific-GENESYS 20 (USA), a una longitud de onda de 540 nm. Los azúcares reductores liberados se calcularon por interpolación en una recta patrón de glucosa.

La actividad celulolítica se expresó en FPU (filter paper units)/mL que equivale a las µmoles de glucosa generadas por min de reacción y por mL de extracto enzimático. La ecuación utilizada para el cálculo del FPU/mL fue la siguiente:

$$\frac{\text{FPU}}{\text{mL}} = \frac{C}{\text{EDR}} \quad (1)$$

Donde C es el cociente entre 7,4 mM y el tiempo de reacción en min y el EDR (*enzyme dilution rate*) es la dilución enzimática con la cual se alcanza el equivalente a 7,4 mM de glucosa con 16 mg de papel filtro. El EDR se calculó por interpolación, con la recta que se obtuvo al graficar las diluciones del extracto enzimático y la concentración de azúcares reductores liberados en cada reacción.

2.4. Determinación del efecto del tipo y tamaño de sustrato en la actividad celulolítica

Para determinar el efecto del tipo y tamaño de sustrato en la actividad celulolítica de los extractos enzimáticos obtenidos tanto en fermentación líquida como sólida, se seleccionó un diseño experimental factorial mixto 2x2, donde se tomó como variables de diseño el tipo y tamaño de sustrato en dos niveles. El tipo de sustrato fue papel filtro y cartón dúplex y el tamaño de sustrato fue 0,25 cm² y 1,00 cm². La variable de respuesta fue la actividad enzimática de los extractos obtenidos. Todos los ensayos de fermentación se realizaron por duplicado.

El análisis estadístico para determinar el efecto del tipo y tamaño de sustrato en la actividad celulolítica, se realizó con el programa Statgraphics Centurion XVI.I.

2.5. Bio-pulpeo de envases multicapa reciclados Tetra Pak®

Se plantearon dos alternativas para remover la celulosa (bio-pulpeo) de los envases de Tetra Pak® reciclados, ambos basados en la acción celulolítica del hongo *T. reesei*.

Como primera opción se trabajó con los extractos enzimáticos con mayor actividad celulolítica generados por *T. reesei* en fermentación líquida y sólida. 10 mL de extracto enzimático con un 5 % (p/v) de envases reciclados estériles cortados en cuadrados de 1,00 cm². Se incubaron durante 48 h a 50 °C y 200 rpm. El avance de la acción enzimática se monitoreó de forma indirecta al cuantificar los azúcares reductores liberados con el método del ácido dinitrosalicílico

(DNS) de Miller (1959) modificado. El ensayo consistió en colocar 250 μ L de una solución de DNS a la muestra, llevar a ebullición por 15 min y centrifugar a 13 300 g por 5 min. La absorbancia del sobrenadante de la muestra diluida 10 veces se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Como segunda opción de bio-pulpeo, se realizó una fermentación líquida de *T. reesei* en medio YP con 5 % de material reciclado durante 7 días a 30 °C y 200 rpm. Las condiciones de fermentación fueron las mismas antes descritas para los sistemas líquidos. Durante la fermentación se midieron, a diferentes intervalos de tiempo, la actividad celulolítica y los azúcares reductores. El proceso se detuvo cuando la actividad alcanzó un valor máximo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Estudio del efecto del tipo y tamaño de sustrato en la actividad celulolítica

Se ensayaron dos sistemas de fermentación para la obtención de enzimas de *T. reesei* CECT 2415, fermentación en medio líquido (SFL) y fermentación en medio sólido (SFS). En cada sistema se estudió el efecto del tipo y tamaño de sustrato sobre la actividad enzimática, para lo cual se utilizó papel filtro y cartón dúplex en dos tamaños diferentes (1,00 cm^2 y 0,25 cm^2).

En las Figuras 1A y 1B, se muestra el perfil de actividad enzimática de los extractos obtenidos en el SFL y el SFS, respectivamente. Se observa que el extracto con mayor actividad celulolítica se obtuvo en el SFS con papel filtro de 0,25 cm^2 (1,15 FPU/mL), seguido de un extracto producto del SFL con cartón dúplex de 1,00 cm^2 (0,5 FPU/mL).

Varios estudios han demostrado que en un SFS, la producción de enzimas celulolíticas es mayor, debido a que las condiciones de fermentación muestran similitud con el ambiente natural, lo que permite un mejor crecimiento de los hongos filamentosos (Barrios-González, 2012). Por otro lado, en un SFL, a pesar de ser una de las técnicas más utilizadas en la producción de enzimas a gran escala por su fácil manejo y mejor monitoreo, no se tiene una alta producción debido a que las condiciones de fermentación como la humedad, el sustrato celulósico, el pH del medio y en especial la velocidad de agitación que no solo influye en la ventilación, el suministro de oxígeno, la eliminación de calor y la homogenización del medio sino que también afecta el desarrollo del micelio, impiden el crecimiento del hongo y por ende la generación de enzimas y su actividad celulolítica (Chen, 2013, Singhania et al., 2010).

Las características del sustrato como el área superficial específica, porosidad, cristalinidad, grado de polimerización, espesor (gramaje), composición del material celulósico o lignocelulósico (Mansfield, Mooney y Saddler, 1999) y el tamaño (Centeno y Pavone, 2015) juegan un rol importante en el progreso de la fermentación y en la producción de enzimas celulolíticas debido a que están estrechamente relacionadas con la accesibilidad del hongo al sustrato.

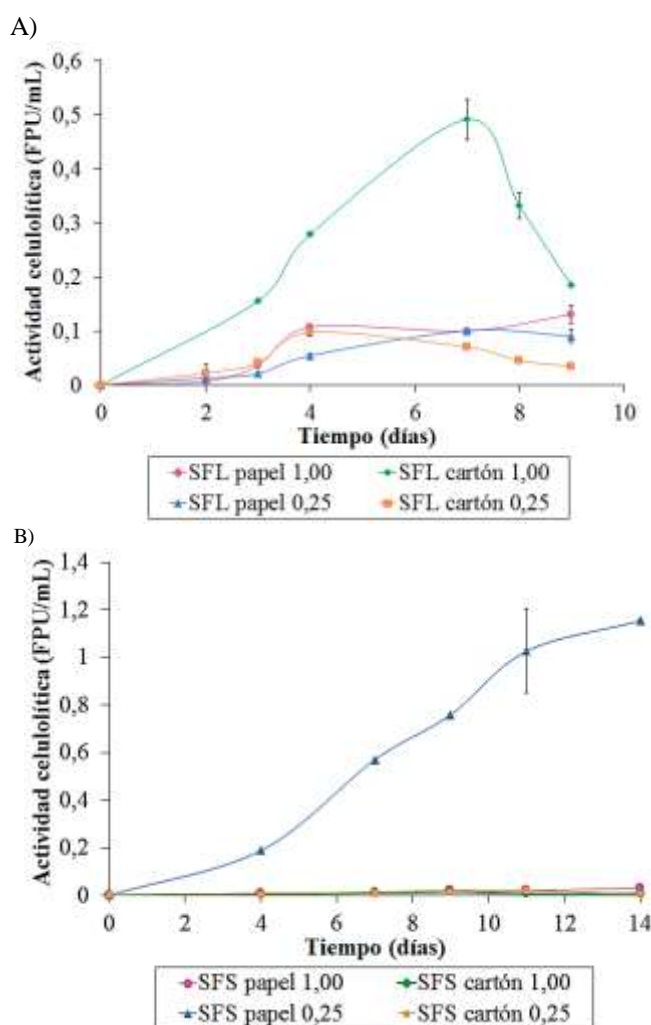


Figura 1. Actividad celulolítica en extractos enzimáticos de *T. reesei* obtenidos en A) Fermentación líquida y B) Fermentación sólida, con papel filtro o cartón dúplex como fuente de celulosa. 1,00 y 0,25 corresponden al tamaño del sustrato en cm^2

El papel filtro y el cartón dúplex son materiales compuestos principalmente por celulosa, convirtiéndolos en sustratos adecuados para la producción de enzimas celulolíticas (Holtzapfel, 2003). Sin embargo, son materiales que difieren en sus características físicas y químicas, así como en su proceso de obtención (Zhang y Lynd, 2004). El papel filtro es un material elaborado a partir de pulpa Kraft blanqueada, donde la materia prima principal es la fibra virgen de algodón, que presenta un 0,1 % de cenizas y un 95 % de α -celulosa cristalina, aproximadamente (Lee, Evans y Woodward, 2000; Zhang y Lynd, 2004).

El cartón dúplex es elaborado a partir de fibras de madera virgen, fibras recicladas o una mezcla de ambas, este material se caracteriza por su bajo índice de cristalinidad, no ser blanqueado, y presentar un alto grado de rigidez y resistencia. Además, tiene un recubrimiento a partir de caolín, talco, carbonato de calcio molido o dióxido de titanio en su superficie, que mejora la suavidad y facilita la impresión (Aguilar-Rivera, 2004; Gronfors, 2010; Marttila, 2012). Estas diferencias entre el papel filtro y el cartón dúplex, influirían en la accesibilidad del hongo a la celulosa y por ende en la actividad enzimática de las celulasas.

Como se mencionó anteriormente, en el SFS se obtuvo mejores resultados al utilizar como sustrato papel filtro de 0,25 cm². Este tamaño, al aumentar el área superficial, mejoraría la accesibilidad del hongo al sustrato, la humectación, oxigenación, entre otras variables, y así facilitar el desarrollo del micelio y la generación de enzimas (Chen, 2013; Pandey et al., 2000).

En el SFL el extracto más activo se obtuvo al utilizar como fuente de sustrato cartón dúplex de 1,00 cm². El mayor gramaje del cartón dúplex (315 g/cm²) en comparación con el papel filtro (85 g/cm²) le permite ocupar, a una misma masa de sustrato, menor volumen en el matraz, lo cual favorece la distribución del sustrato en el medio y evita su aglomeración; esto sumado a la menor cristalinidad de la celulosa presente en el cartón dúplex (Zhang y Lynd, 2004) facilitarían el acceso del hongo a la celulosa, mejorando su hidrólisis y la generación de celulasas.

El tipo de sustrato, tamaño de sustrato y la interacción de ambos tienen un valor $P < 0,05$ que indica que estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la actividad enzimática con un 95 % de nivel de confianza.

3.2. Bio-pulpeo de envases reciclados de Tetra Pak®

Para el bio-pulpeo de los envases reciclados de Tetra Pak® se ensayaron dos alternativas, basadas en la acción celulolítica de *T. reesei*.

Como primera opción para remover la celulosa presente en los envases de Tetra Pak®, se utilizaron los extractos enzimáticos de *T. reesei* obtenidos en condiciones sólidas (0,76 FPU/mL) y líquidas (0,14 FPU/mL). Durante 48 h de incubación de estos extractos con el material reciclado a 50 °C y 200 rpm, se registró la generación de azúcares reductores provenientes de la hidrólisis de la celulosa por la acción de las celulasas presentes en los extractos.

En la Figura 2 se presenta el perfil de azúcares reductores generados en la hidrólisis de la celulosa contenida en los envases reciclados de Tetra Pak® mediante el uso de los extractos enzimáticos de *T. reesei*. Se observa que la generación de los azúcares reductores fue similar para ambos extractos hasta las 24 h y a partir de ese tiempo los valores se estabilizaron. Se observa también que la máxima concentración de estabilización fue proporcional a la actividad celulolítica del extracto. Con el extracto más activo proveniente del SFS se alcanzaron, aproximadamente, 6 veces más azúcares que los obtenidos con el extracto del SFL.

El estancamiento en la producción de azúcares reductores a partir de las 24 h, se podría atribuir a la inhibición de la β -glucosidasa BGL1 por acción de la glucosa, y de las celobiohidrolasas y endoglucanasas por acción de la celobiosa. Tanto glucosa como celobiosa son azúcares reductores producto de la hidrólisis de la celulosa (Casa-Villegas et al., 2017), y que forman parte de los azúcares reductores totales cuantificados en este ensayo.

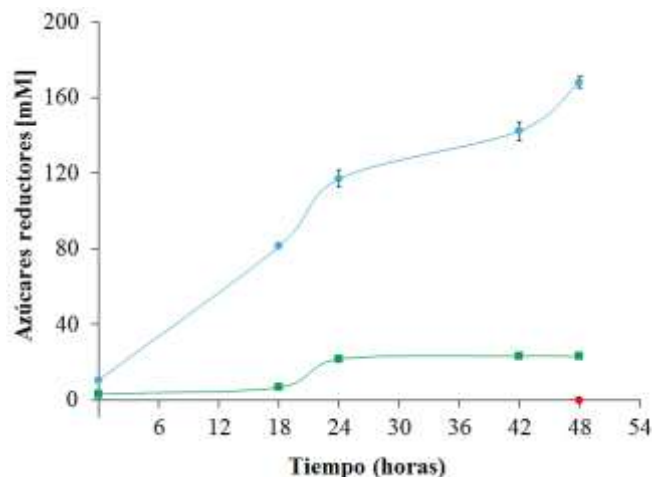


Figura 2. Generación de azúcares reductores a partir de la hidrólisis de celulosa contenida en los envases multicapa reciclados con los extractos enzimáticos de *T. reesei* producidos en: ● SSF papel filtro 0,25 cm², ■ LF cartón dúplex 1,00 cm² y ● Blanco

La cinética de producción de azúcares reductores fue de la mano con la hidrólisis y remoción de la celulosa presente en el material reciclado. A partir de las 24 h, con los dos extractos, no se observó un progreso en el desprendimiento de la celulosa y separación del resto de capas del material reciclado, concluyendo así que la hidrólisis de la celulosa se detuvo. Además, luego de las 48 h de reacción la actividad celulolítica registrada fue muy baja (0,031 FPU/mL para SFS; 0,012 FPU/mL para SFL) debido, probablemente, a los procesos de inhibición de las enzimas.

Como segunda opción de bio-pulpeo, se trabajó en un SFL a 30 °C y 200 rpm durante 9 días, utilizando como sustrato la celulosa contenida en los envases reciclados cortados en cuadrados de 0,25 cm² o 1,00 cm². Durante el tiempo de fermentación se midió la actividad celulolítica.

En la Figura 3 se muestra el perfil de actividad enzimática de los extractos obtenidos en el SFL sobre la celulosa contenida en los envases reciclados de Tetra Pak®. Se observa que no hubo gran diferencia en el valor máximo alcanzado (0,23 FPU/mL) para los dos tamaños utilizados.

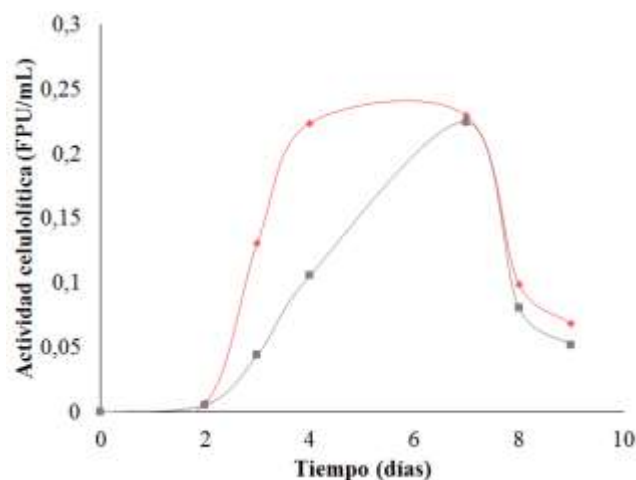


Figura 3. Actividad celulolítica en extractos enzimáticos de *T. reesei* obtenidos mediante un SFL a través de la celulosa contenida en envases Tetra Pak® reciclados cortados en: ● 1,00 cm² y ■ 0,25 cm².

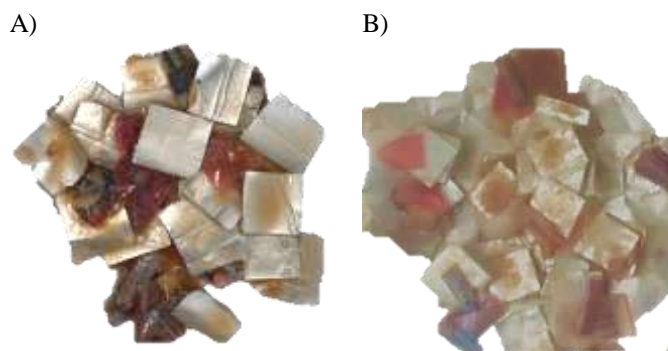


Figura 4. Tetra Pak® reciclado de 1,00 cm² (A) y 0,25 cm² (B) después de 4 días de fermentación líquida con acción directa de *T. reesei*

Sin embargo, en el ensayo con partículas de 1,00 cm², el valor máximo se alcanzó 3 días antes que en el ensayo con partículas más pequeñas. Este comportamiento probablemente se debe a las características de sustrato mencionadas anteriormente, las cuales juegan un rol importante en la accesibilidad del hongo al sustrato y consecuentemente en la actividad celulolítica.

Estas cinéticas de actividad enzimática coincidieron con las cinéticas de remoción de la capa de celulosa de los envases reciclados, monitoreadas visualmente como se observa en la Figura 4. A los 4 días de fermentación, en el ensayo con partículas de 1 cm², toda la capa de celulosa se había desprendido y separado del resto de capas del material; mientras que, en el ensayo con partículas más pequeñas, la remoción total se consiguió cuando la actividad celulolítica alcanzó su valor máximo, es decir en el día 7.

Con respecto a los azúcares reductores presentes en el extracto durante el SFL, las concentraciones estuvieron por debajo de los límites de detección del método (Goncalves et al., 2010; Negrulescu et al., 2012), lo cual indica que el hongo estaría consumiendo dichos azúcares y evitando así la inhibición de las celulasas. Este hecho sumado a la continua producción de enzimas por parte del hongo, explicaría porqué con este método de bio-pulpeo se consiguió el 100 % de remoción de la capa de celulosa y por ende su separación del resto de capas del material.

4. CONCLUSIONES

Tanto en el sistema de fermentación líquido como en el sistema de fermentación sólido, el empleo de dos fuentes de celulosa en diferentes tamaños tuvo un efecto significativo en la actividad celulolítica de los extractos enzimáticos obtenidos.

La mayor actividad celulolítica se obtuvo mediante un sistema de fermentación sólido con papel filtro de 0,25 cm² (1,15 FPU/mL), seguido de un sistema fermentación líquido con cartón dúplex de 1,00 cm² (0,5 FPU/mL).

La mejor opción de bio-pulpeo para la remoción completa de la celulosa contenida en los envases reciclados de Tetra Pak® fue con la acción directa del hongo *T. reesei* en un sistema de fermentación líquido.

AGRADECIMIENTO

Este proyecto de titulación fue realizado gracias al auspicio del proyecto de investigación PII-DECAB-2019-02: “Estrategias para la generación de extractos enzimáticos con actividad celulolítica”, de la Escuela Politécnica Nacional (EPN) que se ejecutó en el Departamento de Ciencias de Alimentos y Biotecnología (DECAB).

REFERENCIAS

- Aguilar-Rivera, N. (2004). El reciclado del papel y cartón. *Elementos: Ciencia y Cultura*, 11(053), 54–56. Recuperado de: <https://elementos.buap.mx/directus/storage/uploads/00000002485.pdf> (Diciembre, 2019)
- Ávila, R., Rivas, B., Hernández, R., y Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *Multiciencias*, 12(2), 129–135. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90424216002%2520C%25C3%25B3mo> (Diciembre, 2019)
- Bajpai, P. (2014). Deinking with Enzymes. *Recycling and Deinking of Recovered Paper*, (2006), 139–153. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416998-2.00008-8>
- Bajpai, P. (2017). Structure and Properties of Cellulose and Nanocellulose. *Pulp and Paper Industry*, 27–40. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811101-7.00003-4>
- Bansal, N., Tewari, R., Soni, R., y Soni, S. (2012). Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management*, 32(7), 1341–1346. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.03.006>
- Barrios-González, J. (2012). Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*, 47(2), 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.11.016>
- Berg, P., y Lingqvist, O. (2019). Pulp, Paper, and packaging in the next decade: Transformational change. *McKinsey y Company Paper and Forest Products*, 1–18. Recuperado de: <https://www.mckinsey.com/industries/paper-forest-products-and-packaging/our-insights/pulp-paper-and-packaging-in-the-next-decade-transformational-change> (Diciembre, 2019)
- Callow, N. V., Ray, C. S., Kelbly, M. A., y Ju, L.-K. (2015). Nutrient Control for Stationary Phase Cellulase Production in *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, 1–43. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.08.012>
- Casa-Villegas, M., Marín-Navarro, J., y Polaina, J. (2017). Synergies in coupled hydrolysis and fermentation of cellulose using a *Trichoderma reesei* enzyme preparation and a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 33(140), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2308-4>
- Centeno, R., y Pavone, D. (2015). Producción de celulasas y biomasa del hongo *Trichoderma reesei* utilizando lodo papelerero como fuente de carbono. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35(1), 40–46. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199441803008> (Noviembre, 2019)
- Chen, H. (2013). Principles of Solid-State Fermentation Engineering and Its Scale-Up. In *Modern Solid State Fermentation*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6043-1>
- Cherry, J. R., y Fidantsef, A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: An update. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4), 438–443. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00099-5)
- Colina, A., Ferrer, A., y Urribarrí, L. (2009). Producción de celulasas por *Trichoderma reesei* Rut C-30 en diferentes sustratos celulósicos. *Revista Tecnica de La Facultad de Ingeniería Universidad Del Zulia*, 32(2), 152–159. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Dashtban, M., Buchkowski, R., y Qin, W. (2011). Effect of different carbon sources on cellulase production by *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) strains. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2(3), 274–286.

- Deswal, D., Khata, Y. P., y Kuhad, R. C. (2011). Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresource Technology*, 102(10), 6065–6072. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.032>
- Druzhinina, I. S., y Kubicek, C. P. (2017). Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1485–1499. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12726>
- Goncalves, C., Rodriguez-Jasso, R. M., Gomes, N., Teixeira, J. A., y Belo, I. (2010). Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Analytical Methods*, 2(12), 2046–2048. <https://doi.org/10.1039/c0ay00525h>
- Gopal, P. M., Sivaram, N. M., y Barik, D. (2019). Paper Industry Wastes and Energy Generation From Wastes. In *Energy from Toxic Organic Waste for Heat and Power Generation*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102528-4.00007-9>
- Gronfors, J. (2010). *Use of fillers in paper and paperboard grades*. Tampere University of Applied Sciences.
- Gruno, M., Våljamäe, P., Pettersson, G., y Johansson, G. (2004). Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 86(5), 503–511. <https://doi.org/10.1002/bit.10838>
- Guo, B., Sato, N., Biely, P., Amano, Y., y Nozaki, K. (2016). Comparison of catalytic properties of multiple β -glucosidases of *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(11), 4959–4968. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7342-x>
- Gusakov, A. V. (2011). Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.004>
- Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., y Montoya, D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>
- Hernández-Melchor, D., Ferrera-Cerrato, R., y Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural y Animal Sciences*, (ahead), 98–112. <https://doi.org/10.4067/s0719-38902019005000205>
- Hidalgo-Salazar, M., Luiz Nieves, F., y Baena, E. (2013). Posibilidades de fabricación con el polietileno aluminio obtenido del reciclaje de envases multicapas. *Informador Técnico, SENA*, 77(2), 100–109. <https://doi.org/10.23850/22565035.51>
- Holtzapfle, M. T. (2003). Cellulose. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 998–1007). <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00185-1>
- Jayasekara, S., y Ratnayake, R. (2019). Microbial Cellulases: An Overview and Applications. In *Intech*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84531>
- Karaboyaci, M., Gizem, G., Kilic, M., y Sencan, A. (2017). Process design for the recycling of Tetra Pak® components. *EJENS, European Journal of Engineering and Natural Sciences*, 2(1), 126–129. Recuperado de: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/263634> (Noviembre, 2019)
- Karkehabadi, S., Helmich, K. E., Kaper, T., Hansson, H., Mikkelsen, N. E., Gudmundsson, M., ... Sandgren, M. (2014). Biochemical characterization and crystal structures of a fungal family 3 β -glucosidase, Cel3A from *Hypocrea jecorina*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(45), 31624–31637. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.587766>
- Lee, I., Evans, B. R., y Woodward, J. (2000). The mechanism of cellulase action on cotton fibers: Evidence from atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 82(1–4), 213–221. [https://doi.org/10.1016/S0304-3991\(99\)00158-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3991(99)00158-8)
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., y Wang, X. (2012). Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. *Computational and Structural Biotechnology*, 2(3), 1–11. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209017>
- Mansfield, S. D., Mooney, C., y Saddler, J. N. (1999). Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress*, 15(5), 804–816. <https://doi.org/10.1021/bp9900864>
- Martínez-Anaya, C., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., y Folch-Mallol, J. L. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(3–4), 119–131. Recuperado de: https://www.medigraphic.com/pdfs/lamico/mi-2008/mi08-3_4i.pdf (Diciembre, 2019)
- Martínez-López, M., Martínez-Barrera, G., Barrera-Díaz, C. E., y Ureña-Núñez, F. (2015). Materiales Provenientes del Reciclamiento de Envases de Tetra Pak® y su Uso en Concreto. In *Materiales Sustentables y Reciclados en la Construcción* (pp. 123–143). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3926/oms.247>
- Marttila, E. (2012). *Material Design and Technology of Cartonboard Packaging*. Tampere University of Applied Sciences - TAMK.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mohite, B. V., y Patil, S. V. (2016). Impact of Microbial Cellulases on Microbial Cellulose Biotechnology. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Cellulase System Properties and Applications*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00004-6>
- Negrulescu, A., Patrulea, V., Mincea, M. M., Ionascu, C., Vlad-Oros, B. A., y Ostafe, V. (2012). Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(12), 2176–2182. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532013005000003>
- Panchapakesan, A., y Shankar, N. (2016). Fungal Cellulases: An Overview. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Cellulase System Properties and Applications*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00002-2>
- Pandey, A., Soccol, C. R., y Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35(10), 1153–1169. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7)
- Pivnenko, K., Eriksson, E., y Astrup, T. F. (2014). Waste paper for recycling: Overview and identification of potentially critical substances. *Waste Management*, 45, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.02.028>
- Rosgaard, L., Pedersen, S., Langston, J., Akerhielm, D., Cherry, J. R., y Meyer, A. S. (2007). Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated Barley straw substrates. *Biotechnology Progress*, 23(6), 1270–1276. <https://doi.org/10.1021/bp070329p>
- Rudin, A., y Choi, P. (2013). Biopolymers. In *The elements of polymer science y engineering* (3 ra). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382178-2.00013-4>
- Salamanca, J., y Vaca, J. (2017). Caracterización de un material compuesto de TetraPak®, reforzado con polietileno de baja densidad (PEBD) y conformado en prensa de calor. *Ingenio Magno*, 8(1), 132–147. Recuperado de: <http://revistas.ustatunja.edu.co/index.php/ingeniomagno/article/view/1394> (Noviembre, 2019)
- Sandle, T. (2014). *Trichoderma*. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 3, 644–646. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00337-2>
- Sarrouh, B., Santos, T., Miyoshi, A., Dias, R., y Azevedo, V. (2012). Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. *Journal of Bioprocessing y Biotechniques*, 1–10. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.S4-002>
- Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Patel, A. K., Larroche, C., y Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(7), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>
- Tetra Pak®. (2019). *Sustainability report 2019*. Recuperado de: <https://assets.tetrapak.com/static/documents/sustainability/sustainability-report2019.pdf> (Diciembre, 2019)
- Treebupachatsakul, T., Nakazawa, H., Shinbo, H., Fujikawa, H., Nagaiwa, A., Ochiai, N., ... Okada, H. (2016). Heterologously expressed *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* is a cost-effective alternative to commercial supplementation of β -glucosidase in industrial ethanol production using *Trichoderma reesei* cellulases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.05.002>

- Turrado, J., Dávalos, M., Fuentes, F., y Saucedo, A. (2012). Envases de Cartón para Líquidos como Fuente de Fibra Secundaria. *Información Tecnológica*, 23(3), 59–66. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642012000300008>
- Woodward, J., y Arnold, S. L. (1981). The inhibition of β -glucosidase activity in *Trichoderma reesei* C30 cellulase by derivatives and isomers of glucose. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(7), 1553–1562. <https://doi.org/10.1002/bit.260230714>
- Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D. J., y Saddler, J. N. (2004). Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 115(1–3), 1115–1126. <https://doi.org/10.1385/ABAB:115:1-3:1115>
- Zapata, M. Y., Galviz-Quezada, A., y Osorio-Echeverri, V. M. (2018). Cellulases production on paper and sawdust using native *Trichoderma asperellum*. *Universitas Scientiarum*, 23(3), 419–436. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC23-3.cpop>
- Zawadiak, J., Wojciechowski, S., Piotrowski, T., y Krypa, A. (2017). Tetra Pak® recycling—current trends and new developments. *American Journal of Chemical Engineering*, 5(3), 37. <https://doi.org/10.11648/j.ajche.20170503.12>
- Zhang, Y. H. Percival, Hong, J., y Ye, X. (2009). Cellulase assay. *Biofuels: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, 581, 213–231. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-214-8>
- Zhang, Yi Heng Percival, y Lynd, L. R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(7), 797–824. <https://doi.org/10.1002/bit.20282>