

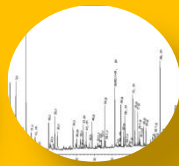
## Proyecto ANII FSE\_2009\_47



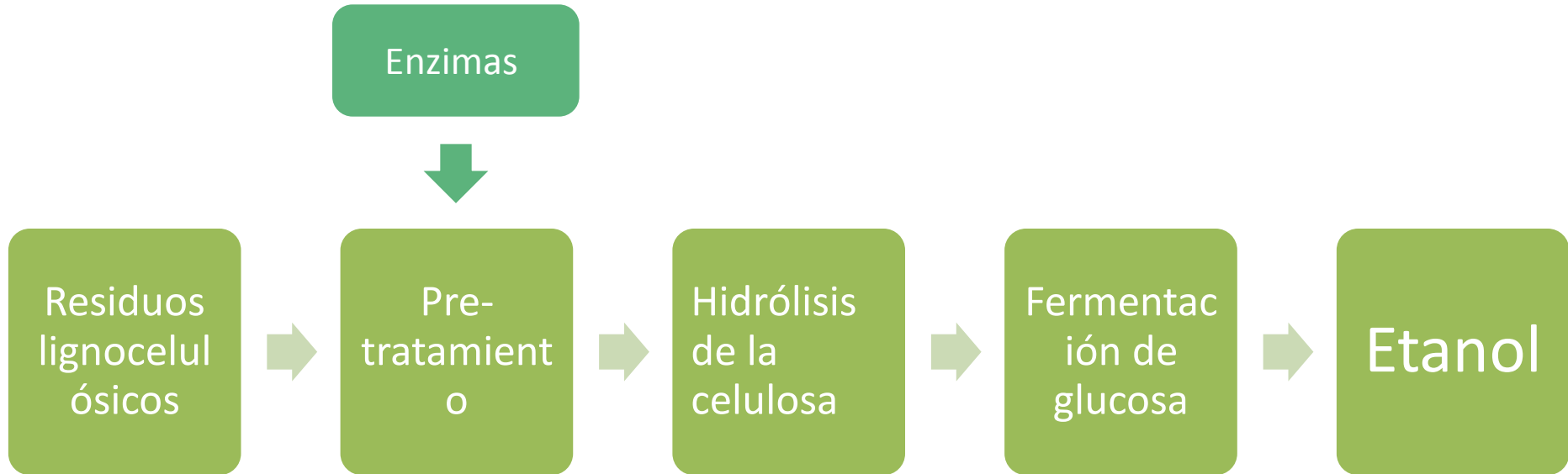
*“Contribuir con el proceso de producción de biocombustibles de segunda generación, mediante la producción de enzimas lacasas que facilitan el acceso al material fermentable”*

**Fecha de realización:** Noviembre 2010 – Diciembre 2012

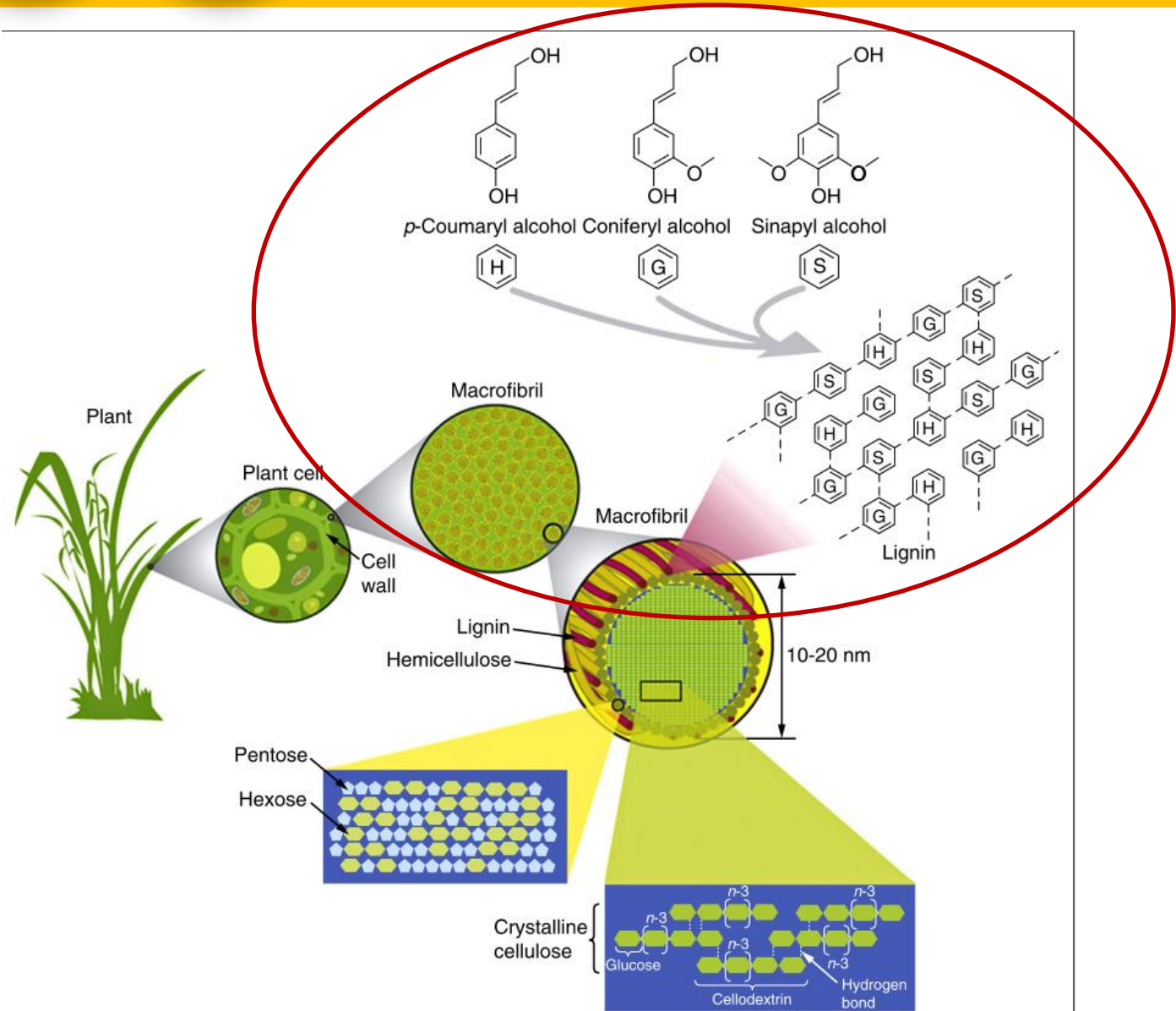
**Responsable:** María del Pilar Menéndez

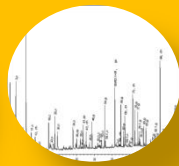


# Introducción



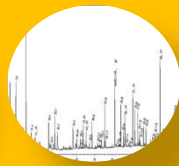
# Introducción





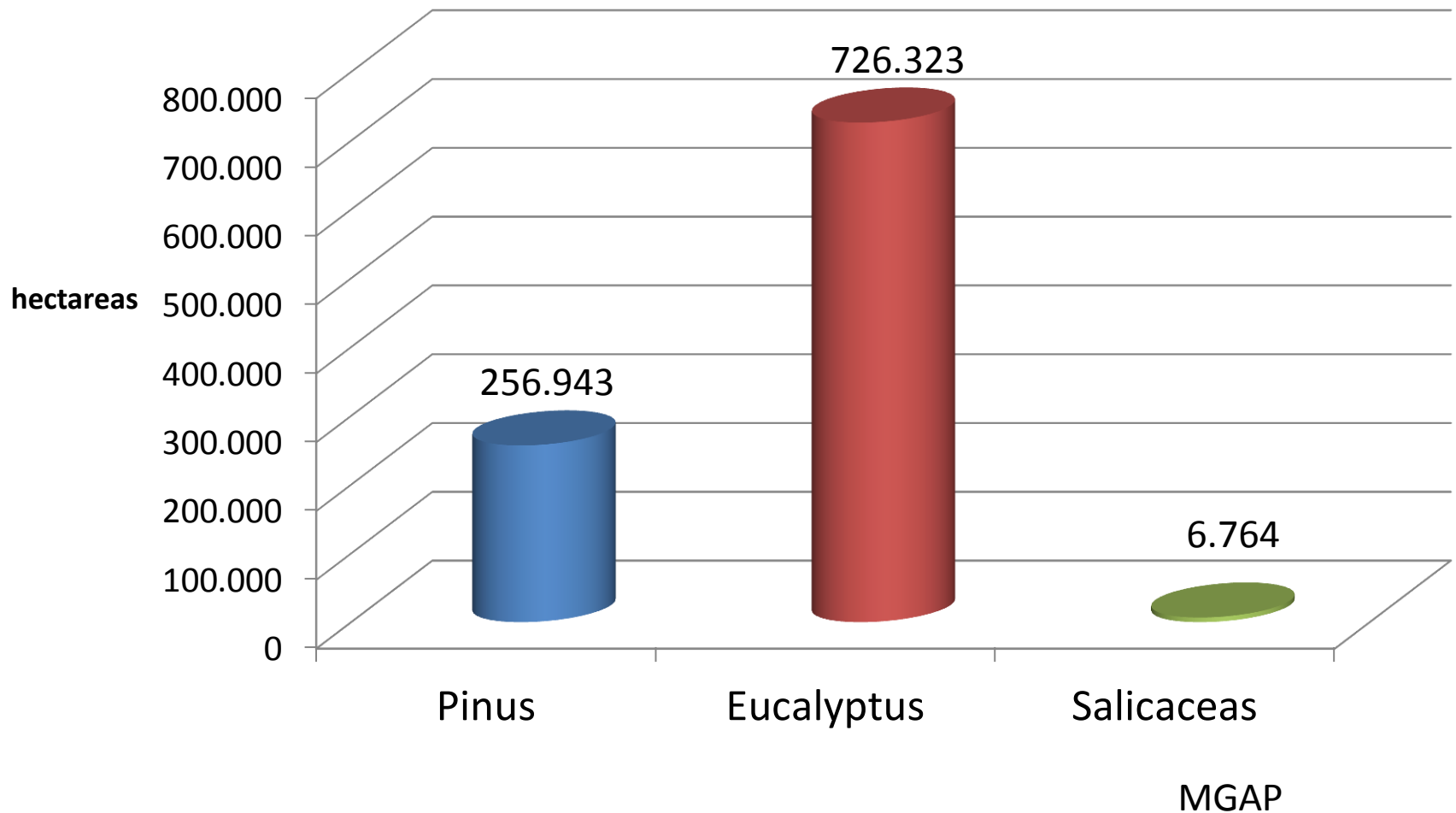
## Objetivo general

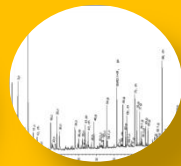
**Fomentar la producción de combustible a partir de residuos agroforestales. Utilización de subproductos de la industria de producción de pulpa celulosa**



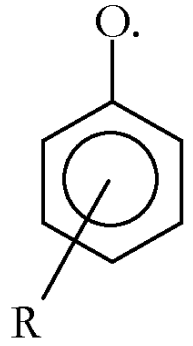
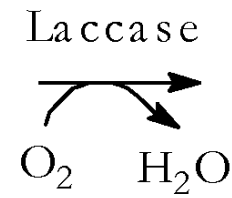
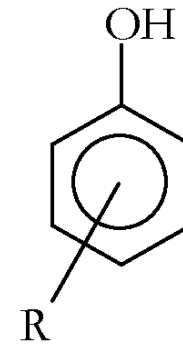
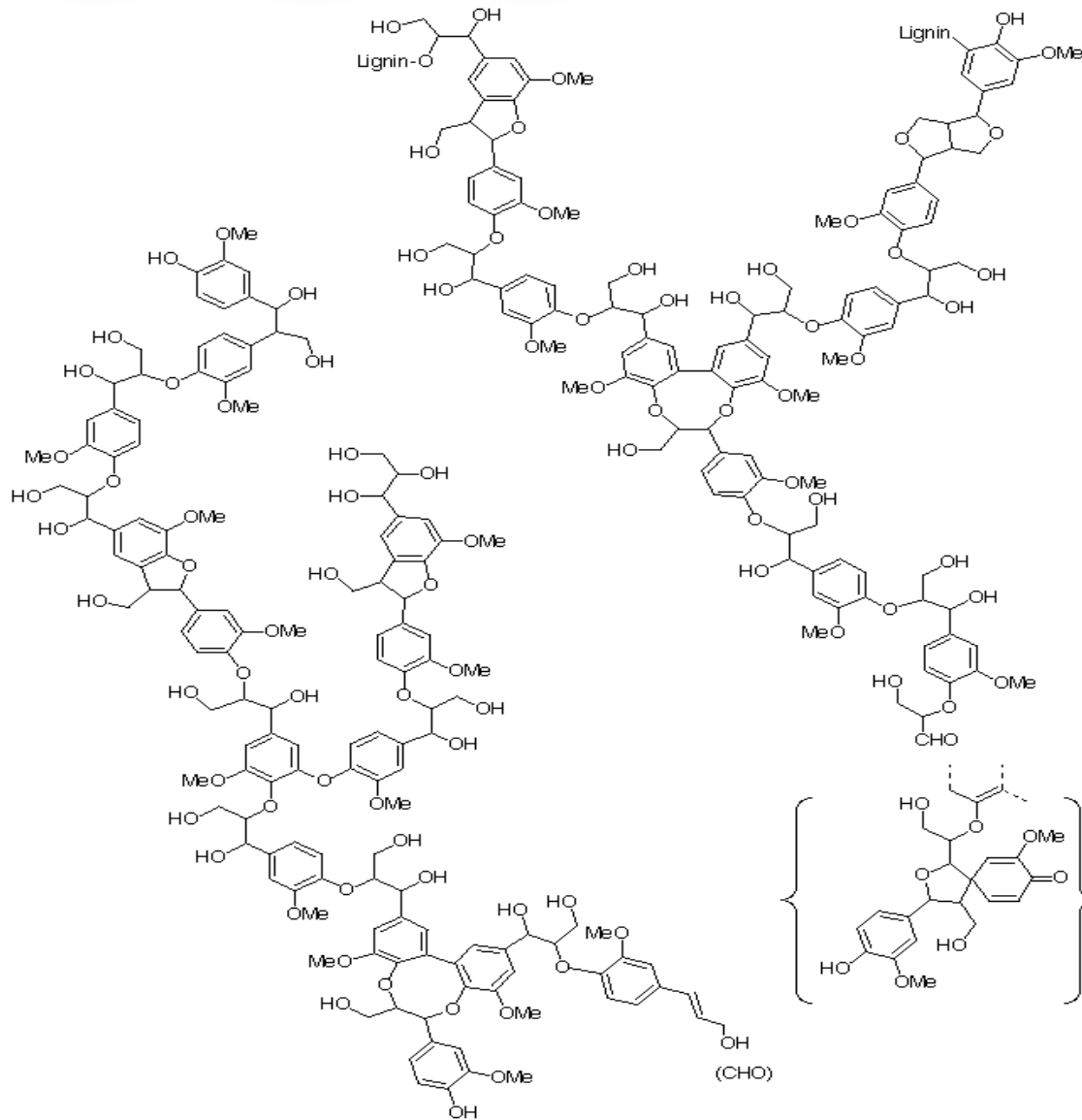
# Introducción

## Superficie forestada bajo proyecto Periodo 1975-2012

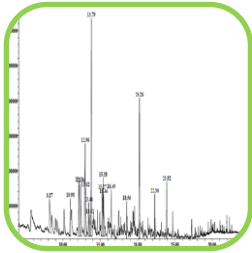




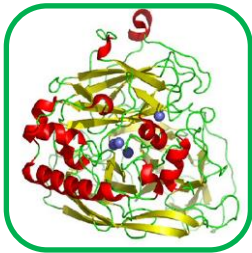
# Introducción



# Objetivos específicos



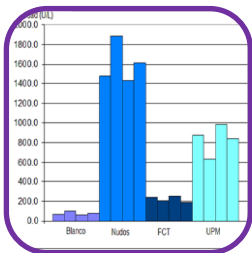
Caracterización de los filtrados obtenidos en FCT (ABO AKADEMI Finlandia) y de UPM



Evaluación de la producción de lacasas por diferentes basidiomycetes



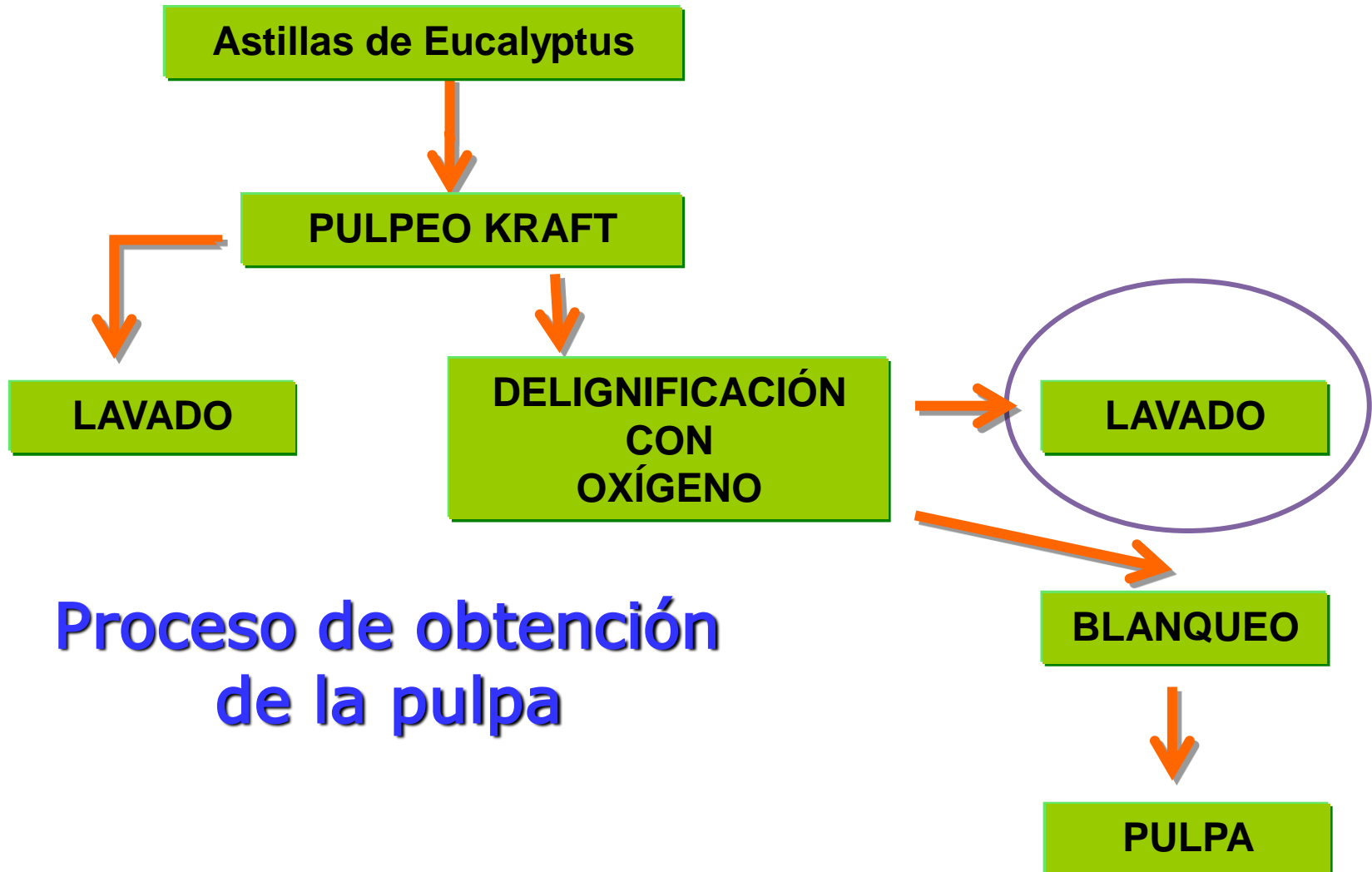
Estudio de la variación en la producción de lacasas con diferentes variables



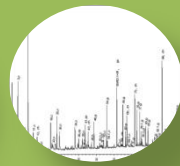
Optimización de la producción de lacasas con las variables seleccionadas



# Obtención de los filtrados



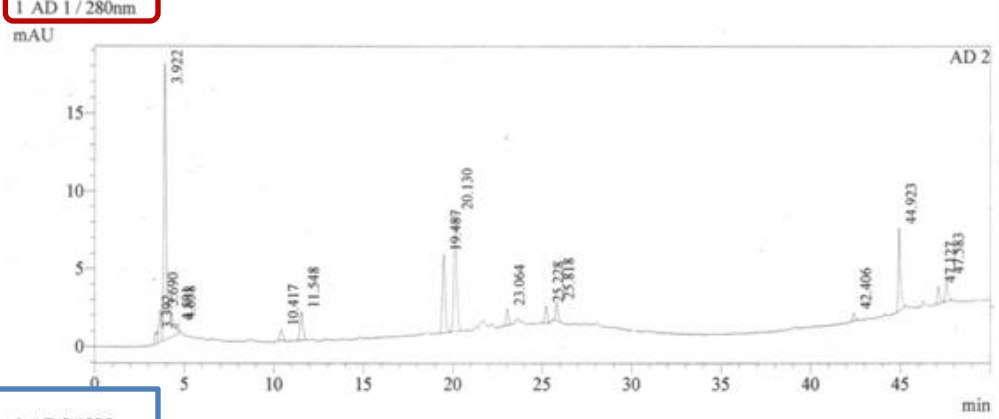
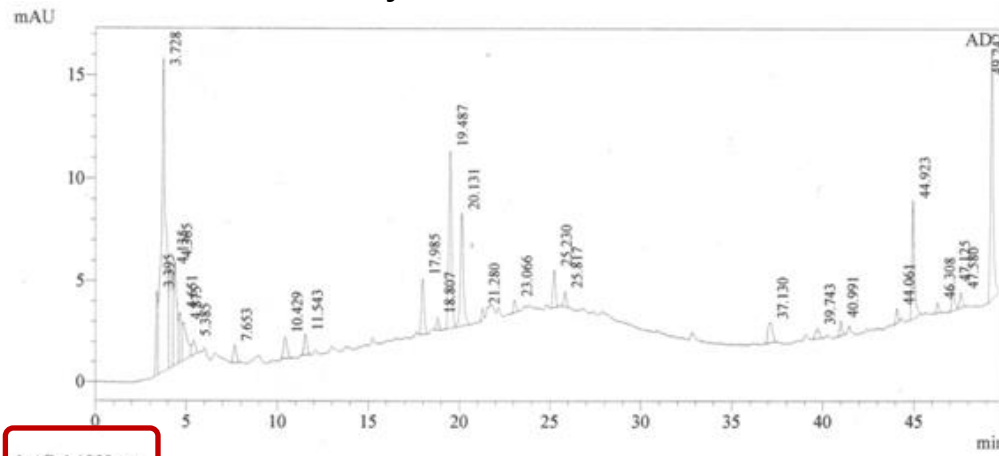




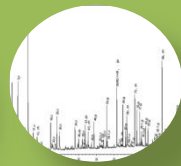
# Caracterización de los filtrados obtenidos en FCT (ABO AKADEMI Finlandia)

## Estudio por HPLC

Columna: C18 (250x4,6 mm i.d),  
 Modo: Gradiente. Solvente de elución A:  
 Metanol-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (999:1), B: H<sub>2</sub>O- H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (999:1).  
 Velocidad de flujo fue de 0,8ml/min.

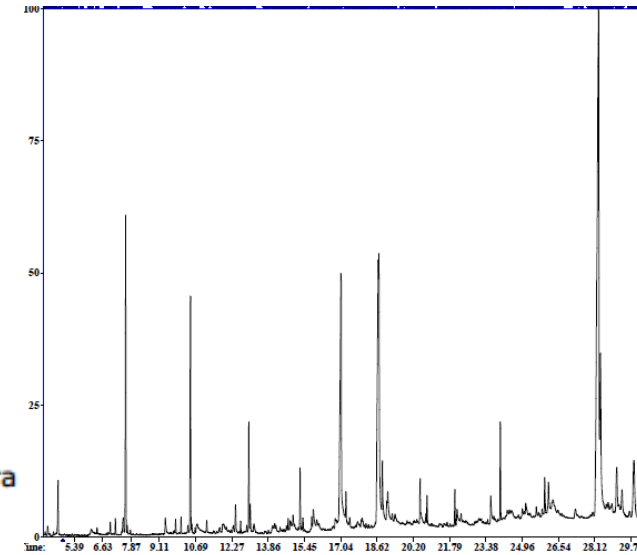
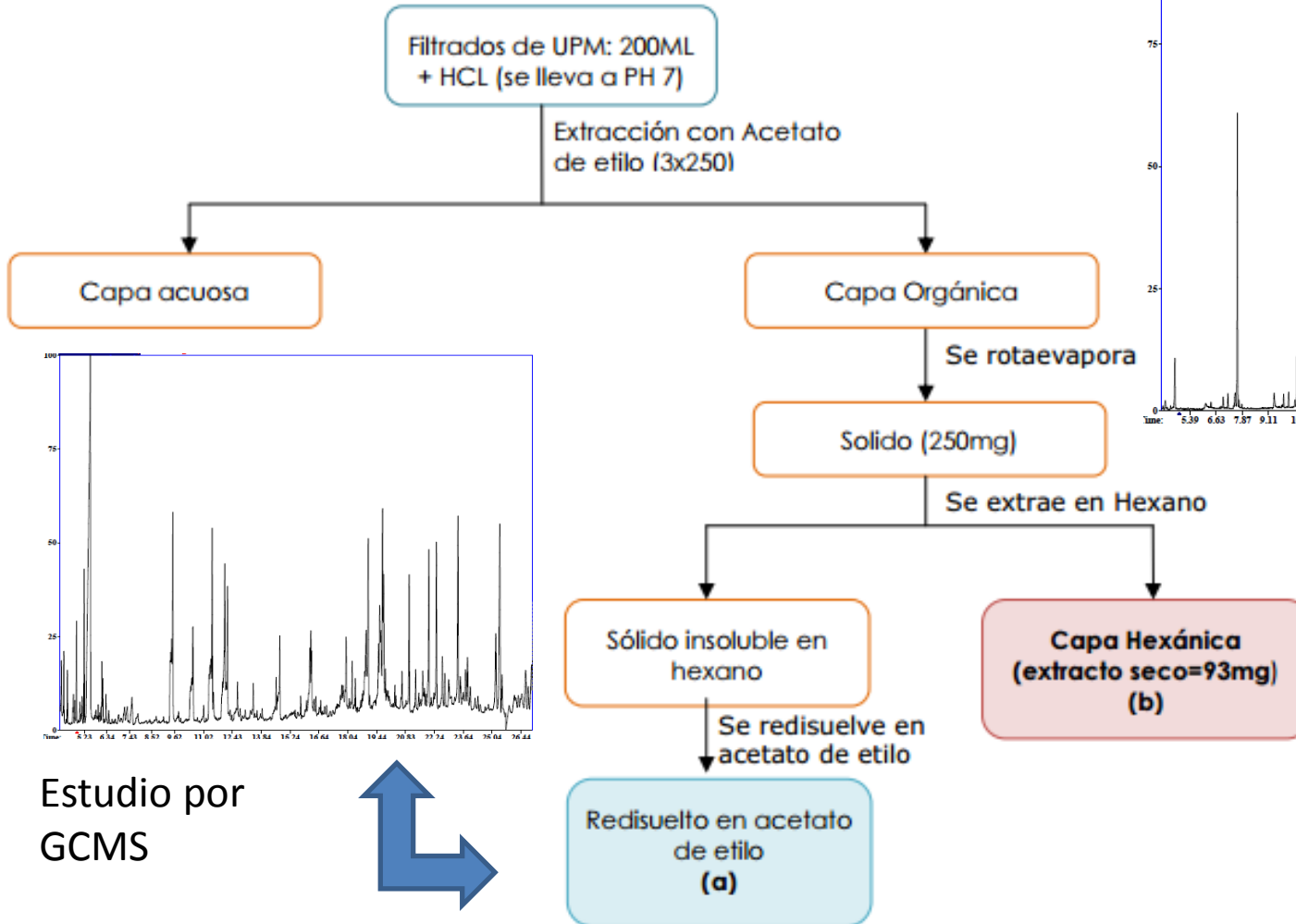


N°	Estándares	Tiempo de retención (min)	Filtrados
1	Ácido gálico	7.653	+
2	Ácido clorogénico	15.853	t
4	Ácido vainílico	19.267	+
5	Vainillina	21.184	t
6	Naringina	22.927	?
8	Guaiacol	24.274	t
11	Ácido ferúlico	25.024	?
12	Ácido salicílico	25.875	+



# Estudios de los filtrados de UPM mediante extracciones sucesivas

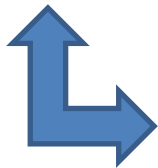
## ESQUEMA 1 (medio neutro acetato de etilo)

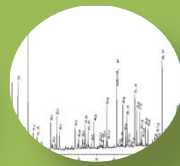


Estudio por GCMS



Estudio por GCMS

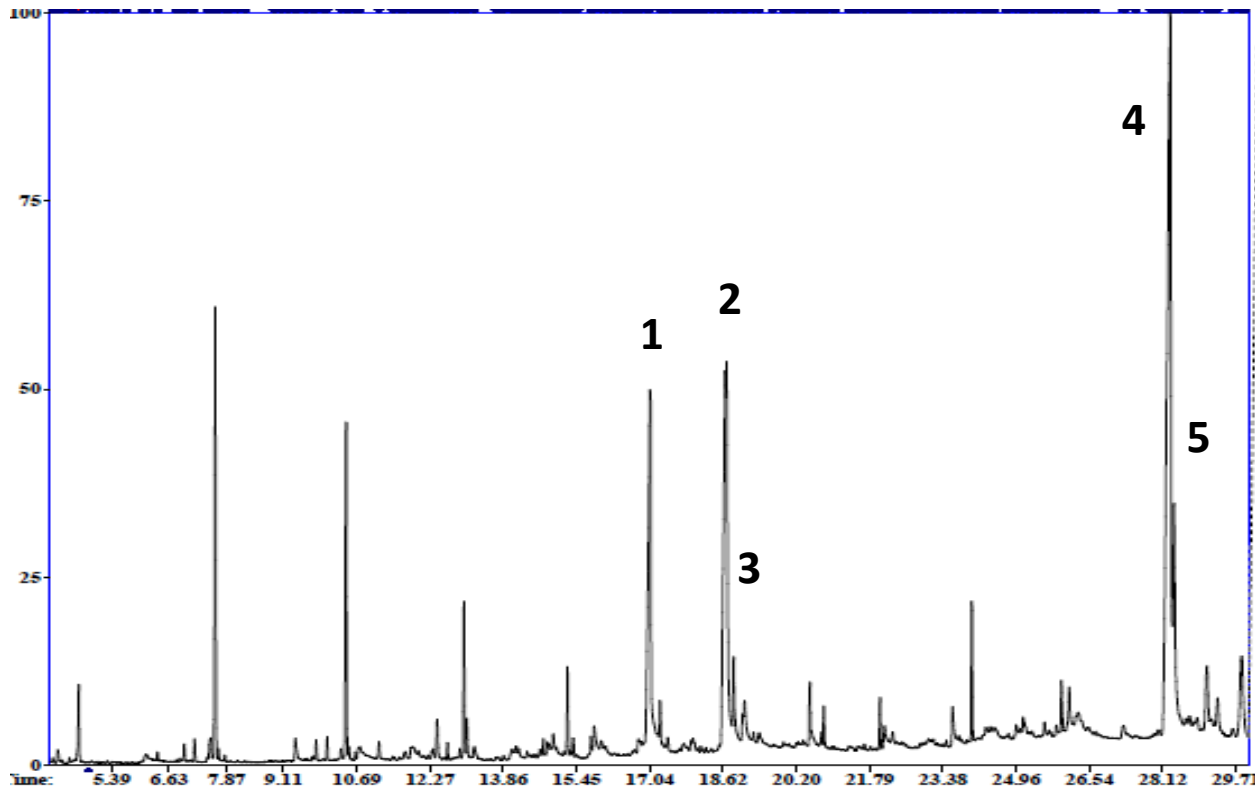


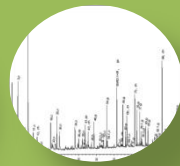


# Estudios de los filtrados de UPM mediante extracciones sucesivas

## Estudio por GCMS Capa hexánica (b)

N	Tr	Compuesto
1	17.0	Ácido palmítico
2	18.6	Ácido linoleico
3	18.7	Ácido oleico
4	28.1	Beta sitosterol
5	28.3	Estigmastanol

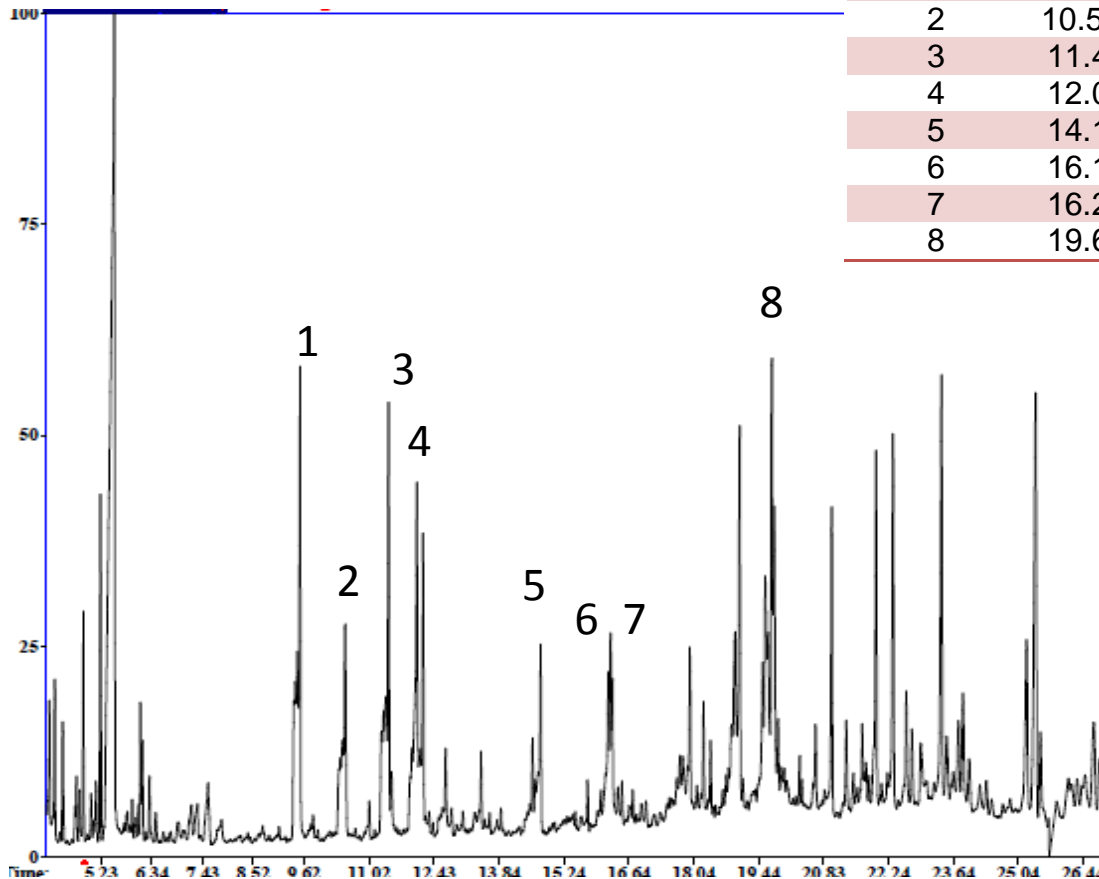




# Estudios de los filtrados de UPM mediante extracciones sucesivas

## Estudio por GCMS

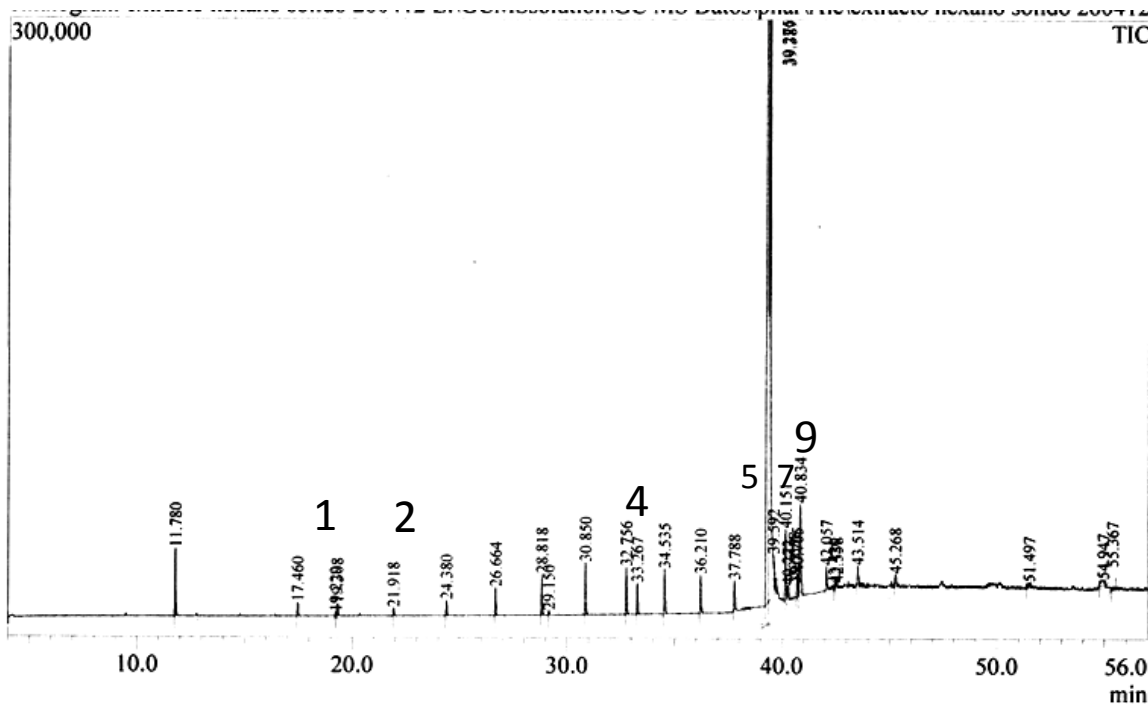
### Sólido redissuelto en acetato de etilo(a)



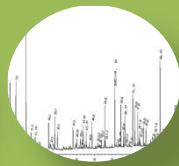
N	Tr	Compuesto
1	9.5	Vainillina
2	10.5	Acetovainillona
3	11.4	Compuesto derivado del guayacol
4	12.0	Compuesto derivado del guayacol
5	14.1	Ácido palmítico
6	16.1	Ácido linoleico
7	16.2	Ácido oleico
8	19.6	Derivados del ácido glucurónico



# Compuestos identificados en el extracto hexánico (c)

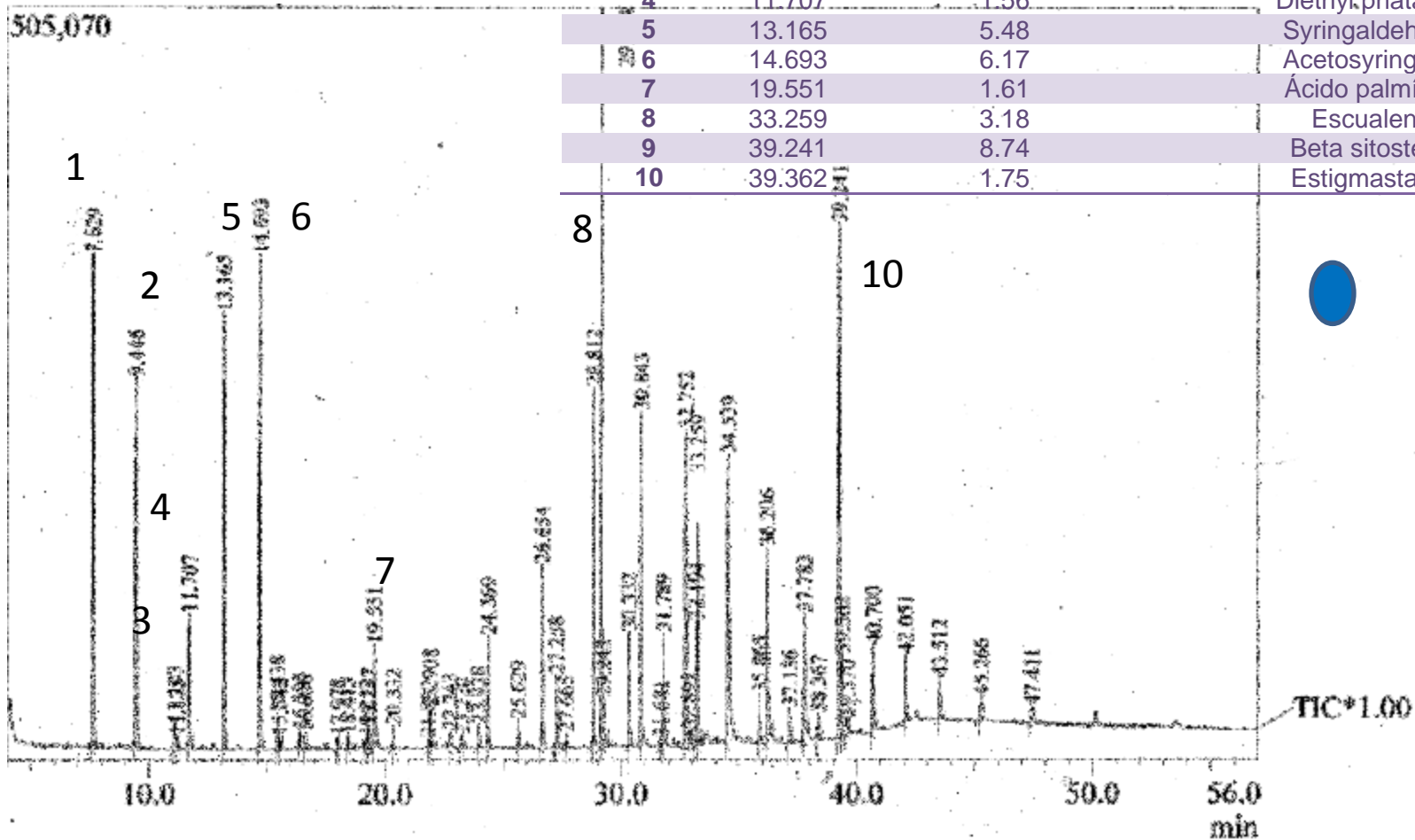


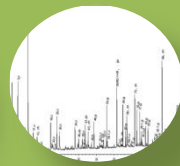
N	Tr	Area %	Compuesto
1	19.687	2.99	Ácido palmítico
2	22.736	2.19	Ácido linoleico
3	22.867	3.22	Ácido oleico
4	33.266	1.64	Tran-escualeno
5	39.334	55.06	Beta-sitosterol
6	39.432	23.27	Estigmasterol
7	40.155	2.97	Cycloartenol
8	40.270	1.13	3,5-estigmastadien-7-one
9	40.828	5.12	Fitosterol no identificado



# Compuestos identificados en el extracto clorofórmico (d)

N	Tr	Area %	Compuesto
1	7.629	7.89	Vainillina
2	9.446	5.31	Acetoguyacona
3	11.103	0.46	Acido Isovainillico
4	11.707	1.56	Diethyl.phatalato
5	13.165	5.48	Syringaldehide
6	14.693	6.17	Acetosyringona
7	19.551	1.61	Ácido palmítico
8	33.259	3.18	Escualeno
9	39.241	8.74	Beta sitosterol
10	39.362	1.75	Estigmastanol

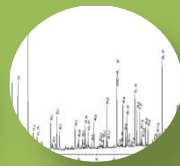




# Compuestos identificados en el extracto clorofórmico

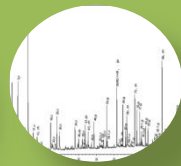
<b>Muestras</b>	<b>Contenido total de fenoles</b>	
	mg de AGE /g de muestra seca	mg de AGE/g de pulpa
<b>Filtrados FCT</b>	18,45	0,40
<b>Filtrados UPM</b>	13,34	-





# Estudios de los filtrados mediante Py-GC-MS

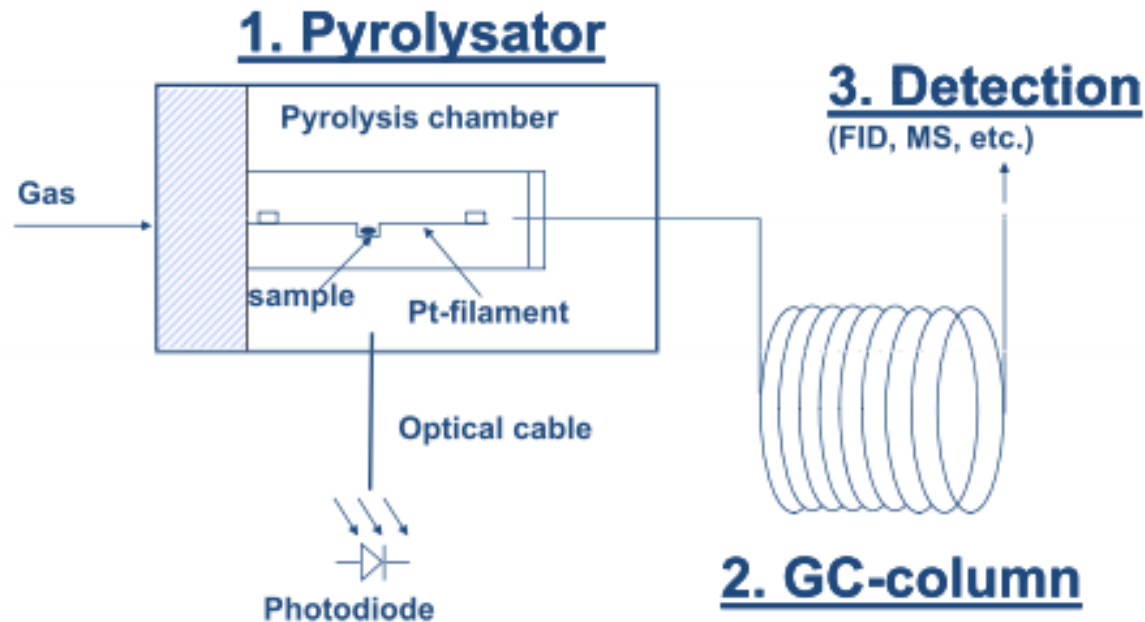
- La técnica de Py-GC-MS permite el análisis de biopolímeros.
- En iguales condiciones los materiales producen el mismo patrón de productos de pirolisis.
- Es una técnica sensible y rápida de llevar a cabo.

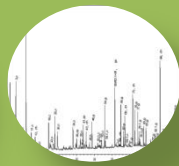


# Pirólisis Analítica (Py-GC/MS)

## ¿En qué consiste?

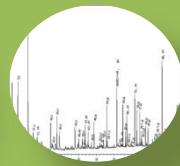
En la descomposición a altas temperaturas de la muestra en ausencia de oxígeno y la posterior identificación de los fragmentos producidos utilizando técnicas cromatográficas





## ¿Por qué utilizarla?

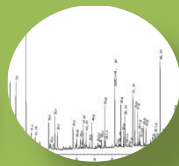
- Es una técnica sensible y rápida, para analizar biopolímeros
- La cantidad de muestra requerida es pequeña (10-100 $\mu$ g)
- La preparación de la muestra es simple (secado y tamizado)
- Tiempo de análisis es corto (1 hora aproximadamente).



# Pirólisis Analítica (Py-GC/MS)

## ¿Por qué utilizarla?

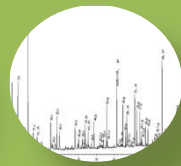
- En iguales condiciones los materiales producen el mismo patrón de productos de pirólisis
- Se realiza el análisis sin ningún tipo de tratamiento previo.
- La fragmentación térmica se produce en un rango de milisegundos . Los productos de la degradación así obtenidos sufren pocas reacciones secundarias y proporcionan una información más detallada de la molécula original.



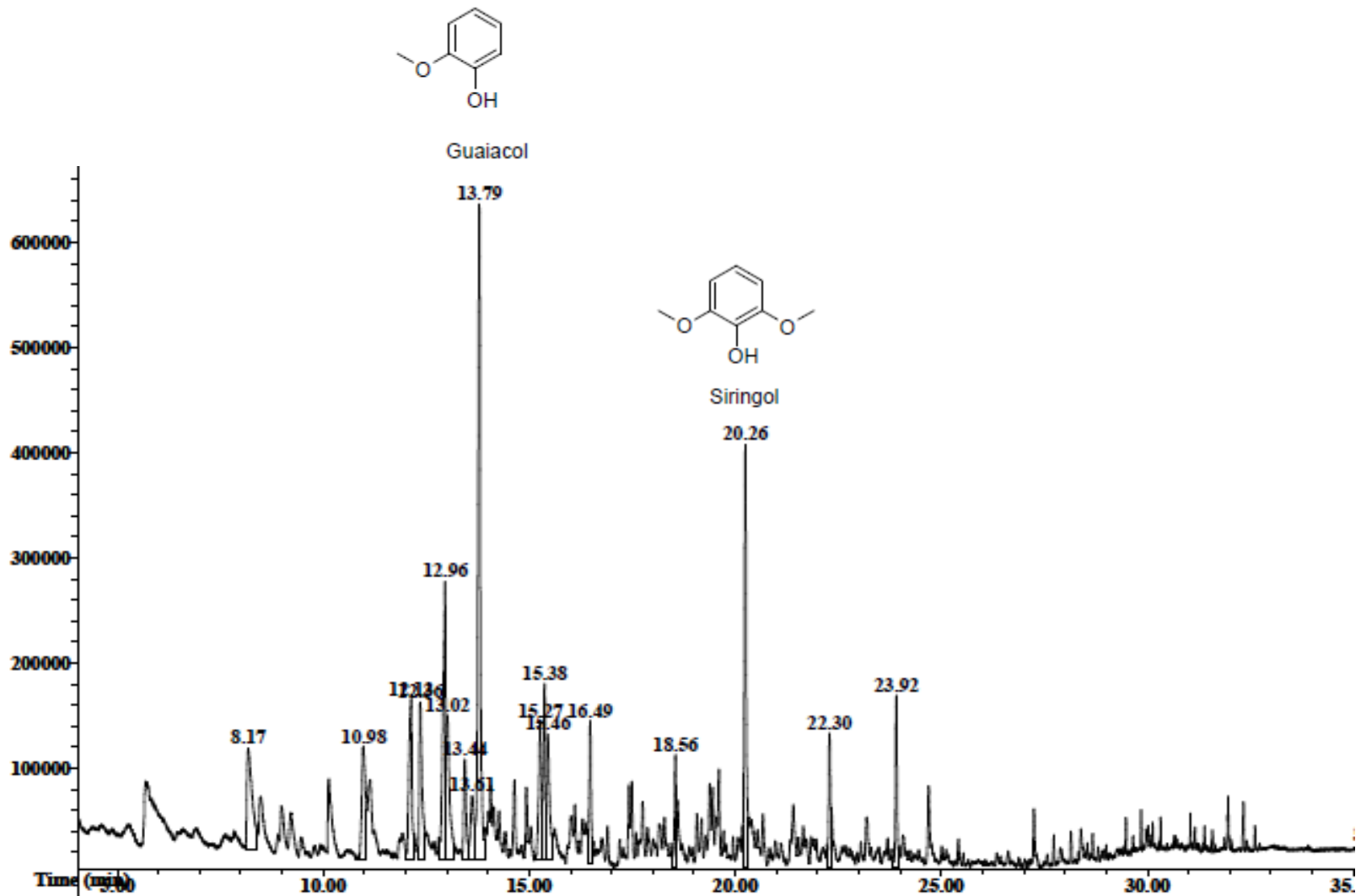
# Pirólisis filtrados FCT, UPM

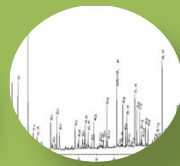
## Condiciones de trabajo utilizadas

- Pirolizador: PIROJECTOR II SGE
- GC: HP 5890 series II
- MS: HP 5971
- Columna: ELITE 5, 30m de longitud, 0.25mm de diámetro interno y 0.25um de espesor de film.
- Condiciones para la pirólisis de las muestras (FCT y UPM):
- Temperatura de pirólisis 450°C
- Condiciones del GC: temperatura del inyector 250°C, temperatura del detector 300°C,
- Condiciones de la corrida: Tinicial: 45°C por 5 minutos, luego 6°C/min hasta 180°C y 25°C/min hasta 290°C manteniéndose la temperatura por 5min.



# Caracterización de los filtrados obtenidos en FCT (ABO AKADEMI Finlandia)

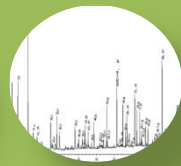




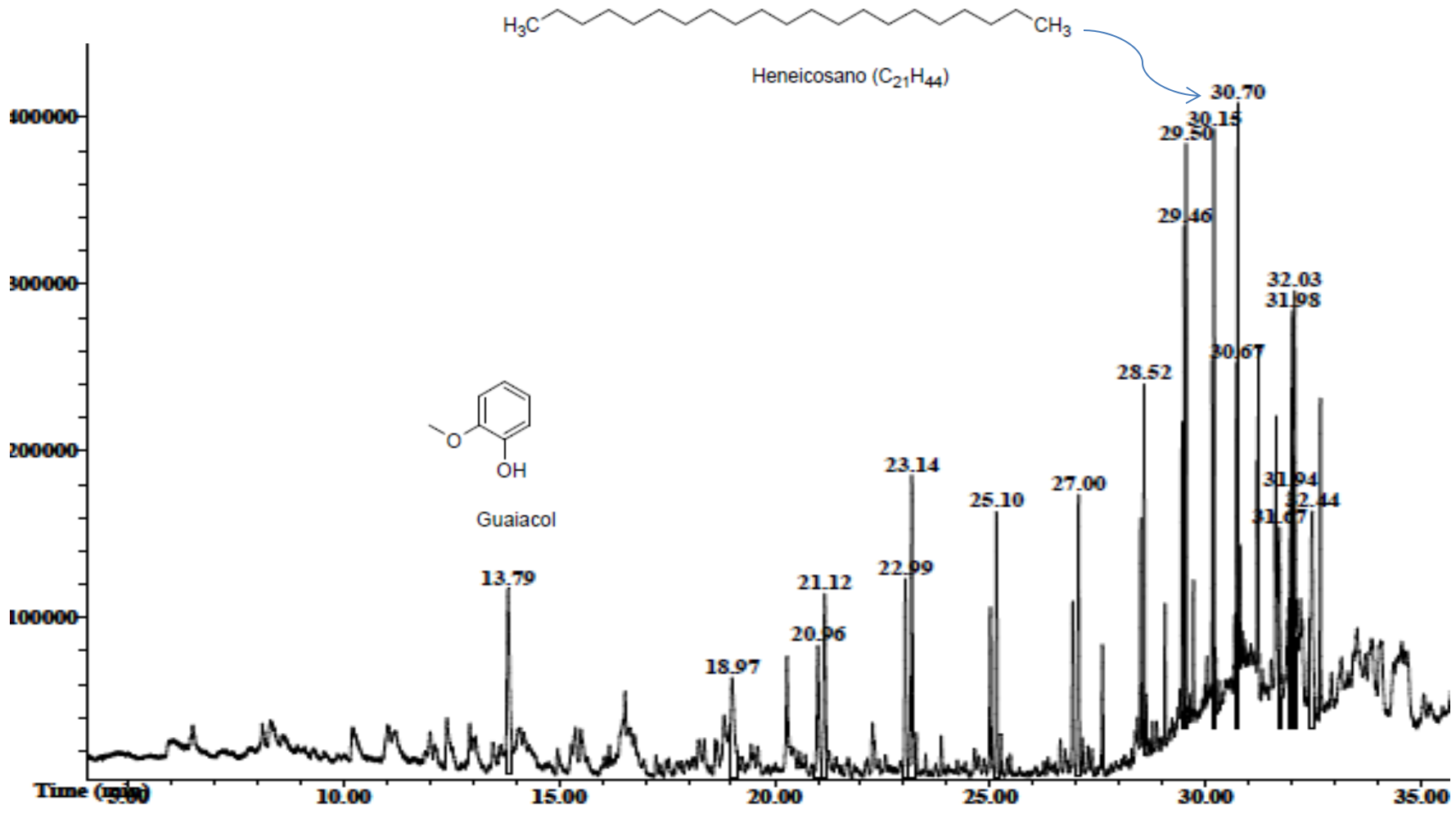
# Caracterización de los filtrados obtenidos en FCT (ABO AKADEMI Finlandia)

## Pirolisis filtrados FCT

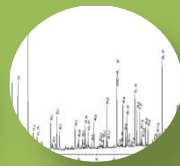
Compuesto	Tiempo de retención	Área%	Origen
2-Cyclopenten-1-one, 2-methyl-	8,18	4,29	C
2-Cyclopenten-1-one, 3-methyl-	10,14	2,31	C
Phenol	10,98	2,66	L
2-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-methyl	12,13	4,17	C
2,3-Dimethyl-2-cyclopenten-1-one	12,36	4,29	C
Phenol, 2-methoxy-	13,79	12,69	L
2-Methoxy-4-methylphenol	16,49	2,73	L
Phenol, 4-ethyl-2-methoxy-	18,56	1,33	L
Phenol, 2,6-dimethoxy-	20,26	7,29	L
2,6-dimethoxy-4-methylphenol	22,3	2,5	L
syringol,4-ethyl	23,92	1,74	L
Syringol, 4-vinyl	24,71	1,44	L



# Caracterización de los filtrados obtenidos en UPM



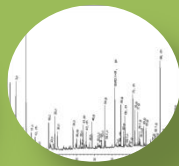




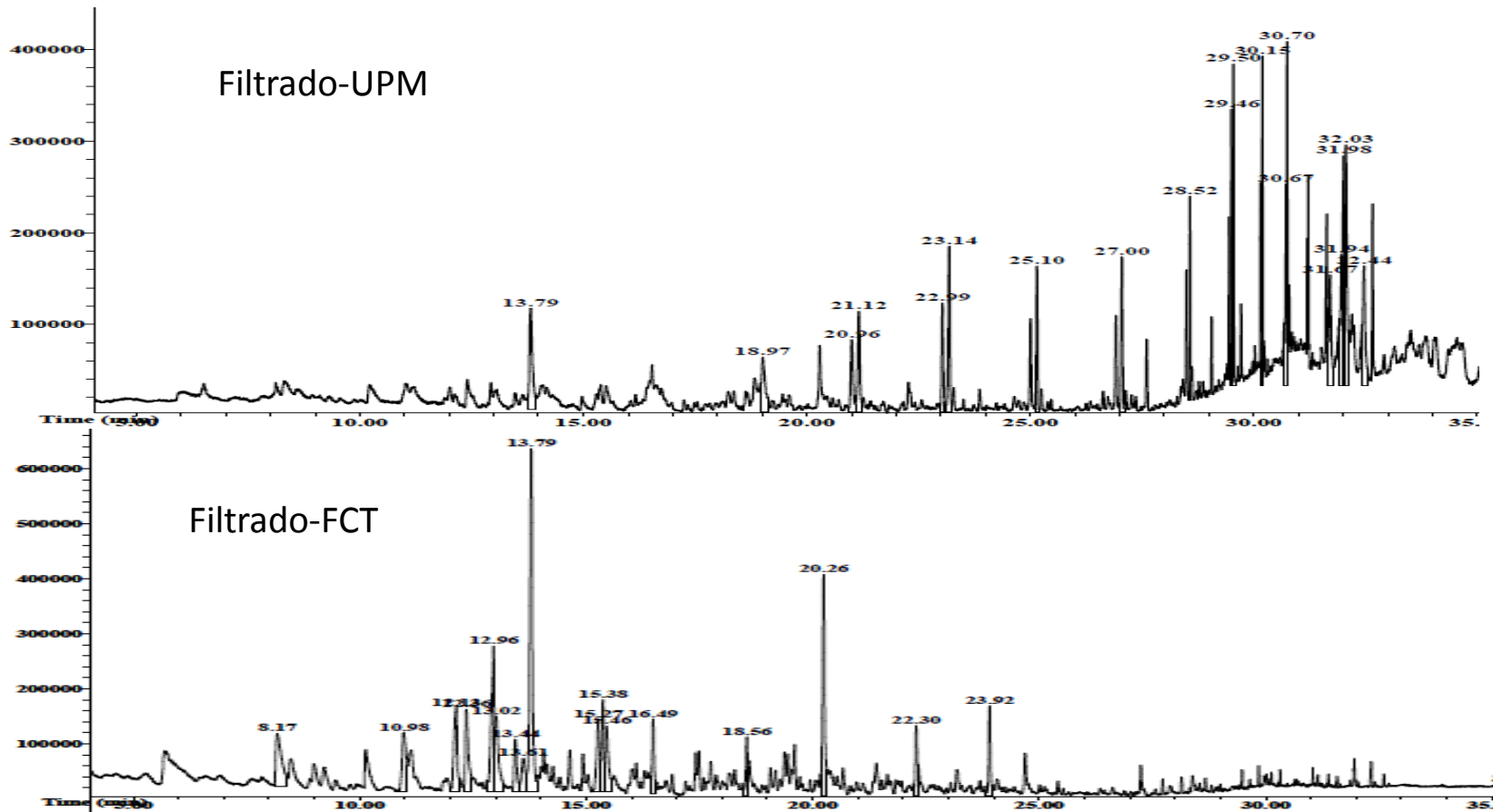
# Caracterización de los filtrados obtenidos en UPM

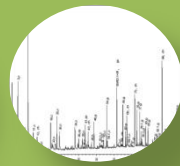
## Pirolisis filtrados UPM

Compuesto	Tiempo de retención	Area%
Phenol, 2-methoxy-	13,8	3,48
1-Pentadecene	20,96	2,13
Tetradecane	21,12	2,75
1-Hexadecanol	22,99	2,37
Pentadecane	23,14	3,71
1-Hexadecanol	24,96	2,1
Hexadecane	25,11	2,81
Heptadecane	27	3,08
Octadecane	28,53	2,23
Nonadecane	29,46	2,85
2-Heptadecanone	29,5	3,28
Eicosane	30,15	2,53
1-Octadecene	30,68	2,35
Heneicosane	30,71	3,36
Hexatriacontane	31,6	2,78



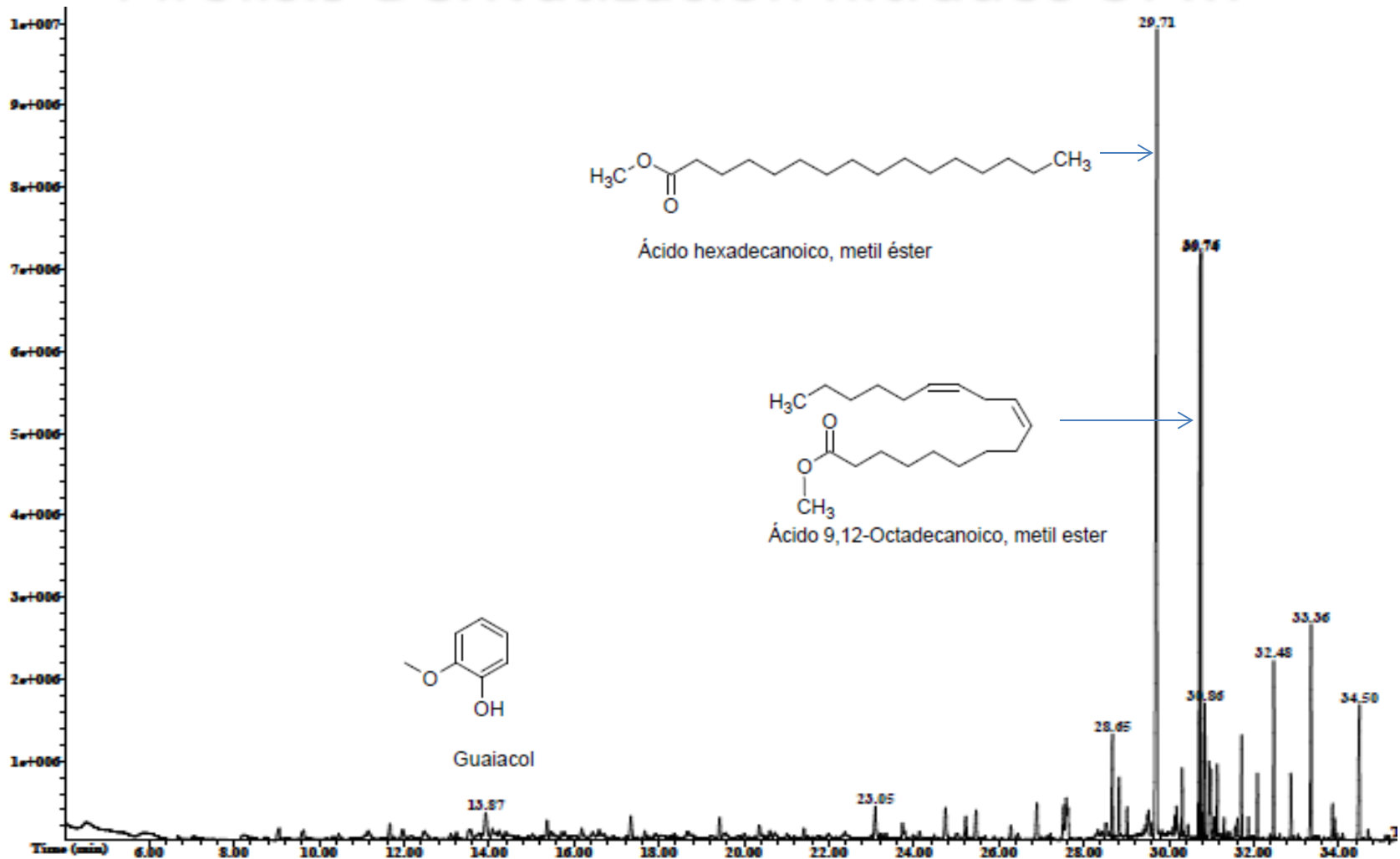
# Caracterización de los filtrados obtenidos en FCT (ABO AKADEMI Finlandia)

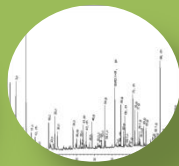




# Caracterización de los filtrados obtenidos en UPM

## Pirolisis-Derivatización filtrados UPM

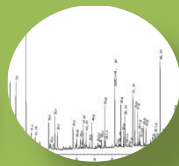




# Caracterización de los filtrados obtenidos en UPM

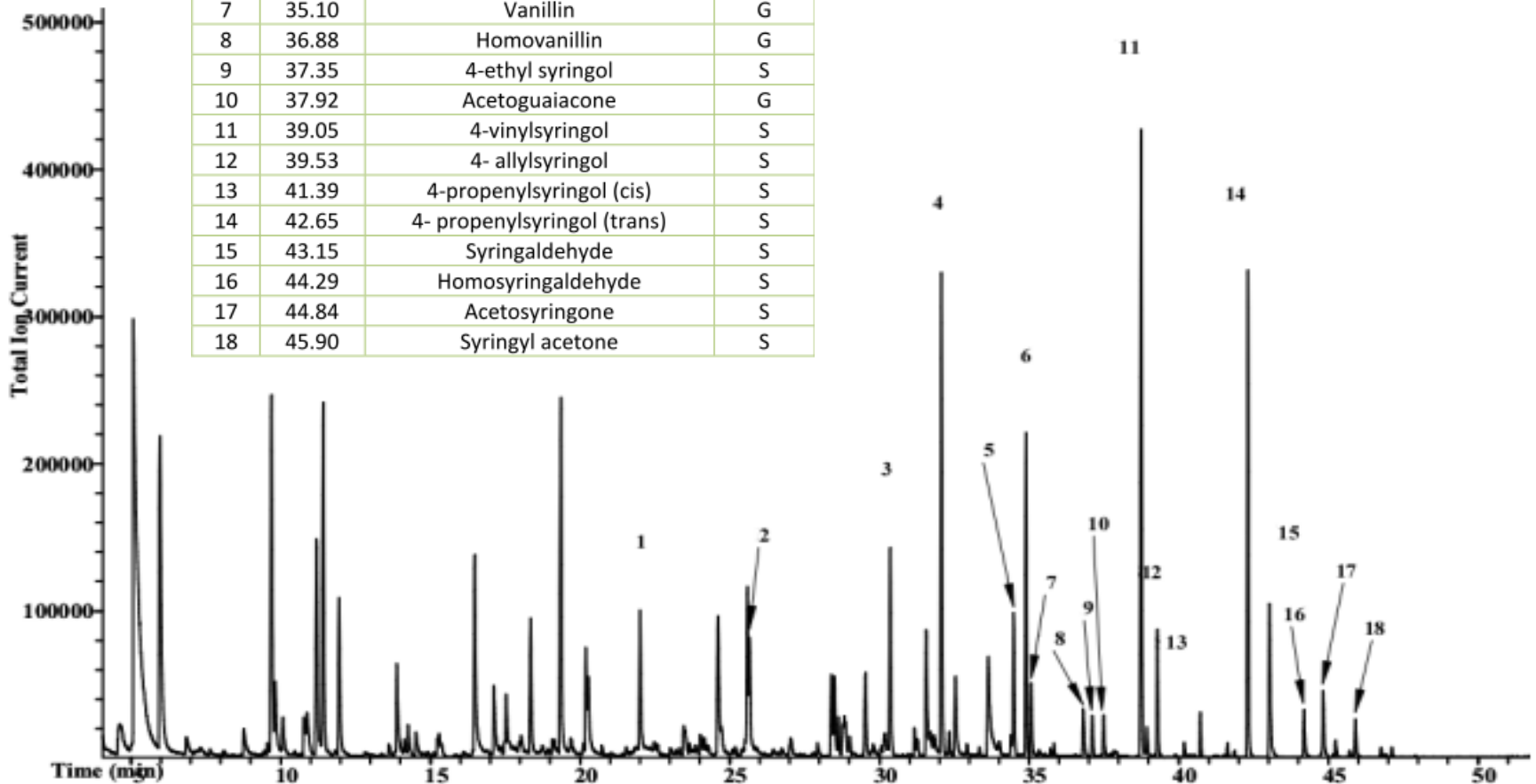
## Pirolisis-Derivatización filtrados UPM

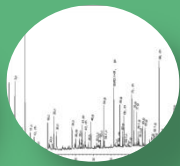
Compuesto	Tiempo de retención	Area%
Phenol, 2-methoxy-	13,87	1,53
Benzaldehyde, 3,4-dimethoxy-	23,05	1,42
Ethanone, 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-	24,71	1,53
Ethanone, 1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-	26,87	1,52
Tetradecanoic acid, methyl ester	27,5	1,47
Pentadecanoic acid, methyl ester	28,81	1,4
Hexadecanoic acid, methyl ester	29,71	23,11
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	30,74	17,73
8-Octadecenoic acid, methyl ester	30,76	10,95
Octadecanoic acid, methyl ester	30,86	2,24
6,9-Octadecadienoic acid, methyl este	30,96	1,51
Eicosanoic acid, methyl ester(C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub> )	31,72	1,57
Octadecanoic acid, methyl ester	32,48	3,07
Docosanoic acid, methyl ester	33,36	5,29
Tetracosanoic acid, methyl ester	34,5	4,27



# Caracterización de la madera de *Eucalyptus grandis*

Peak	RT(min)	Compound	Origin
1	22.03	Guaiacol	G
2	25.69	4-Methylguaiacol	G
3	30.39	Vinylguaiacol	G
4	32.10	Syringol	S
5	34.52	Isoeugenol (trans)	G
6	34.93	4-methylsyringol	S
7	35.10	Vanillin	G
8	36.88	Homovanillin	G
9	37.35	4-ethyl syringol	S
10	37.92	Acetoguaiacone	G
11	39.05	4-vinylsyringol	S
12	39.53	4- allylsyringol	S
13	41.39	4-propenylsyringol (cis)	S
14	42.65	4- propenylsyringol (trans)	S
15	43.15	Syringaldehyde	S
16	44.29	Homosyringaldehyde	S
17	44.84	Acetosyringone	S
18	45.90	Syringyl acetone	S

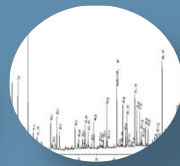




# Evaluación de la producción de lacasas por diferentes basidiomycetes

Se utilizaron siete cepas de basidiomycetes. El medio utilizado para el crecimiento del hongo fue Extracto de Malta 5% p/v.

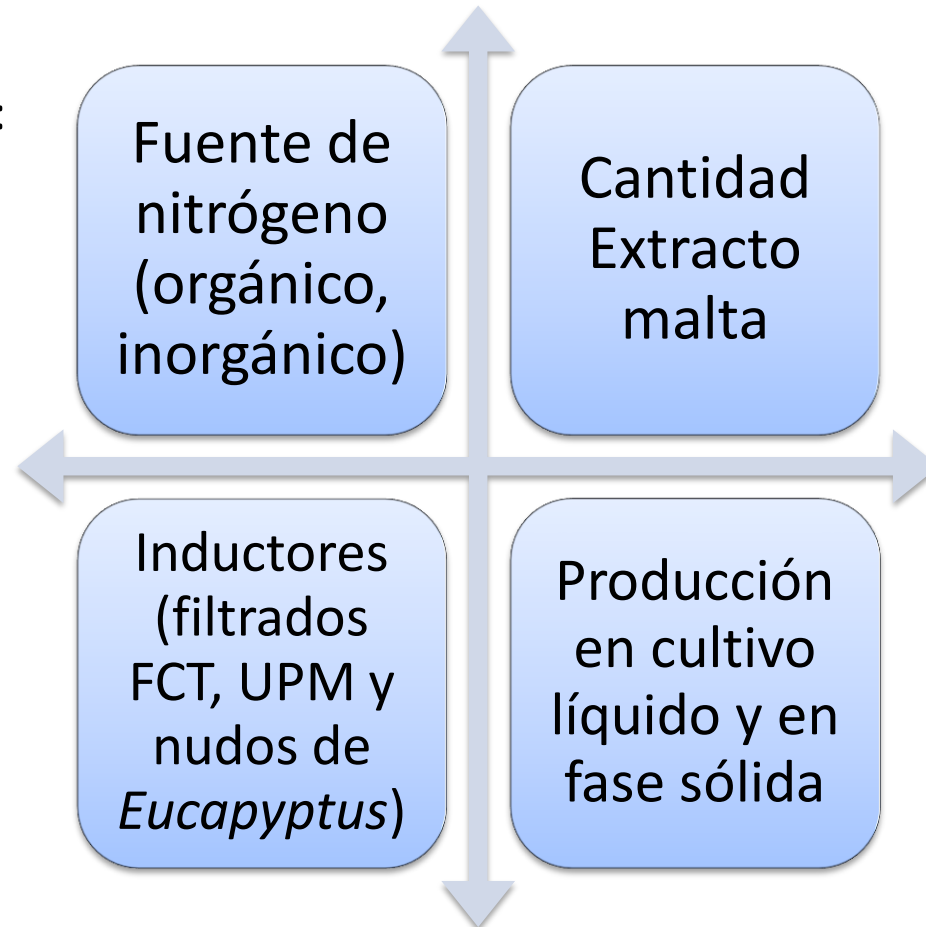
Cepa	Actividad lacasa máxima (U/L)
<i>Inocutis jamaicensis</i> (1467)	0
<i>Porostereum crassum</i> (1436)	0
<i>C.torrendi</i> (1480)	0
<i>Trametes versicolor</i> (1487)	0,85
<i>Dichostereum sordulentum</i> (1488)	860
<i>Phanaerochaete aculeata</i> (1489)	0
<i>Gymnopillus spectabilis</i> (7423)	300



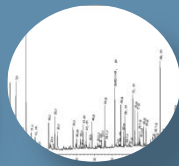
# Estudio de la variación en la producción de lacasas con diferentes variables

La producción de enzimas ligninolíticas es altamente dependiente del organismo y de las condiciones nutricionales en las que crezca.

Se estudiaron a lo largo del proyecto:



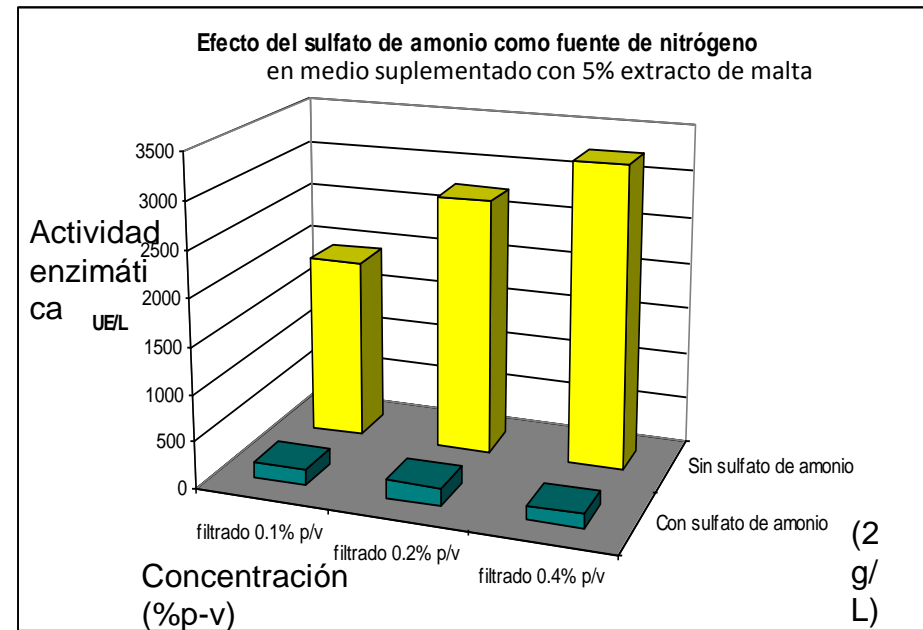
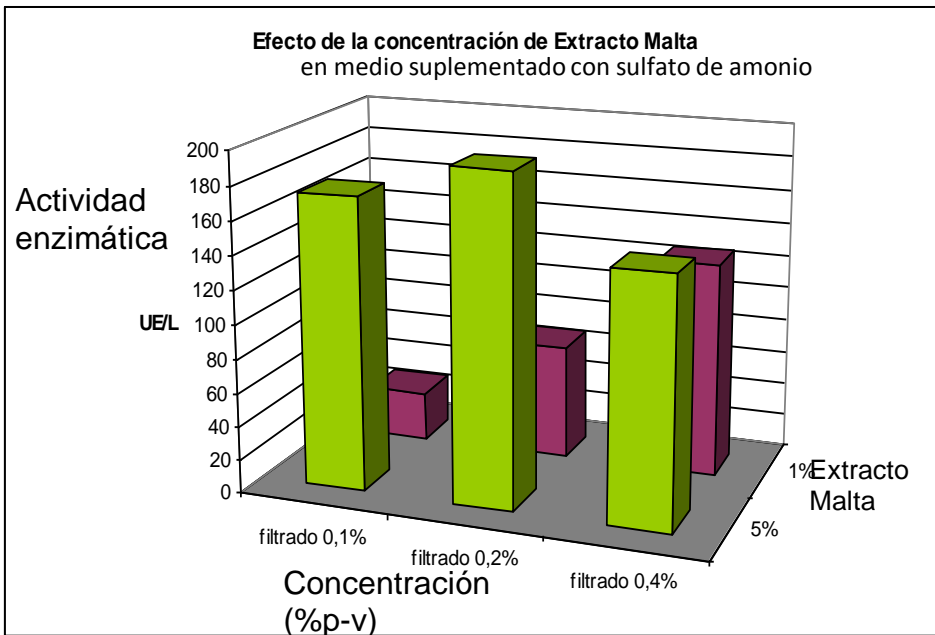
Los datos fueron analizados usando Análisis de varianza (ANOVA) para encontrar las interacciones entre las variables y la respuesta.



# Estudio de la variación en la producción de lacasas con diferentes variables

Ejemplos de los análisis realizados

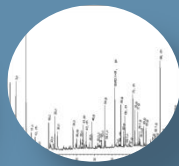
## Efecto de la cantidad de extracto malta y la presencia de sulfato de amonio



\* El crecimiento del hongo y la actividad lacasa es mayor con el aumento de concentración del extracto malta (de 1% a 5%).

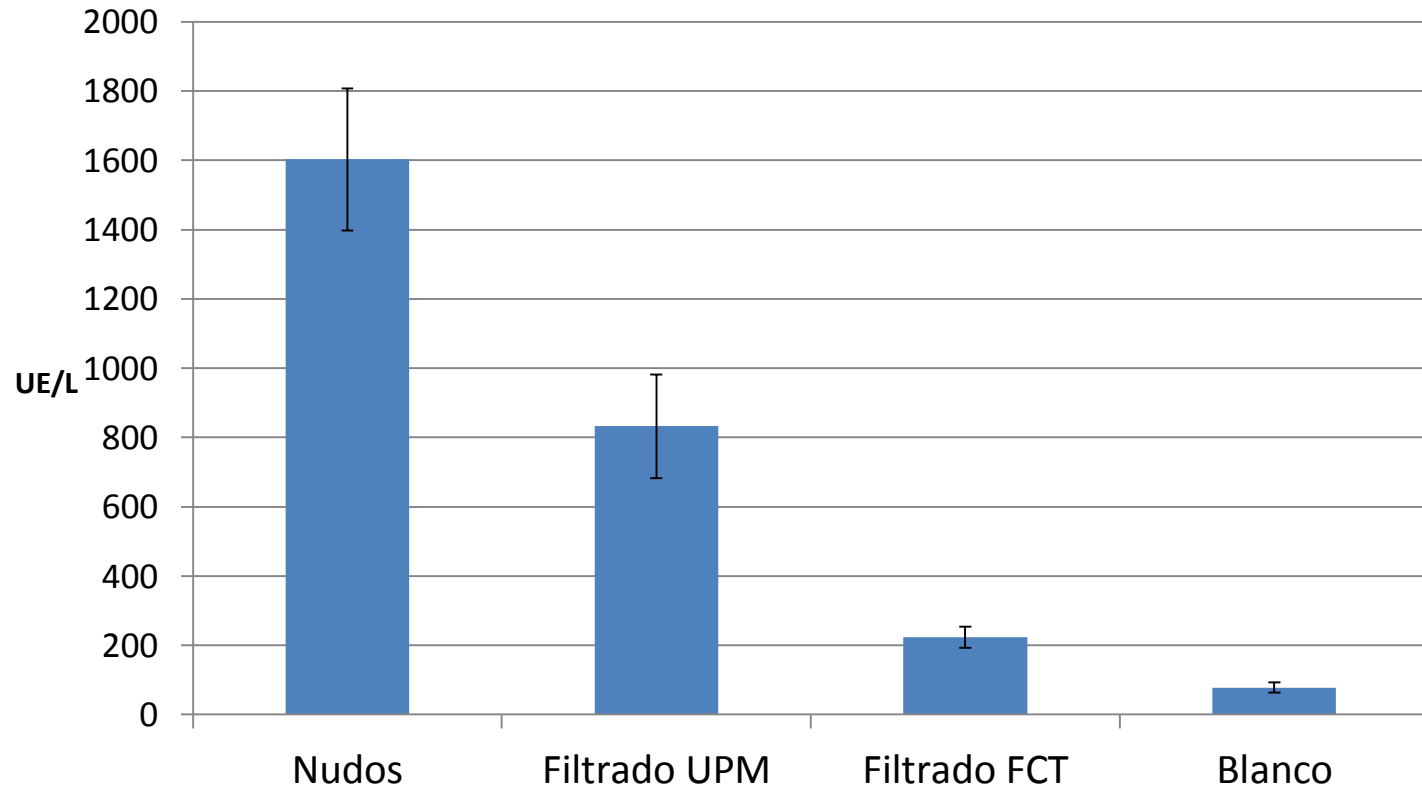
\* La actividad lacasa aumenta cuando el medio es pobre en sulfato de amonio





# Estudio de la variación en la producción de lacasas con diferentes variables

## Influencia de diferentes inductores



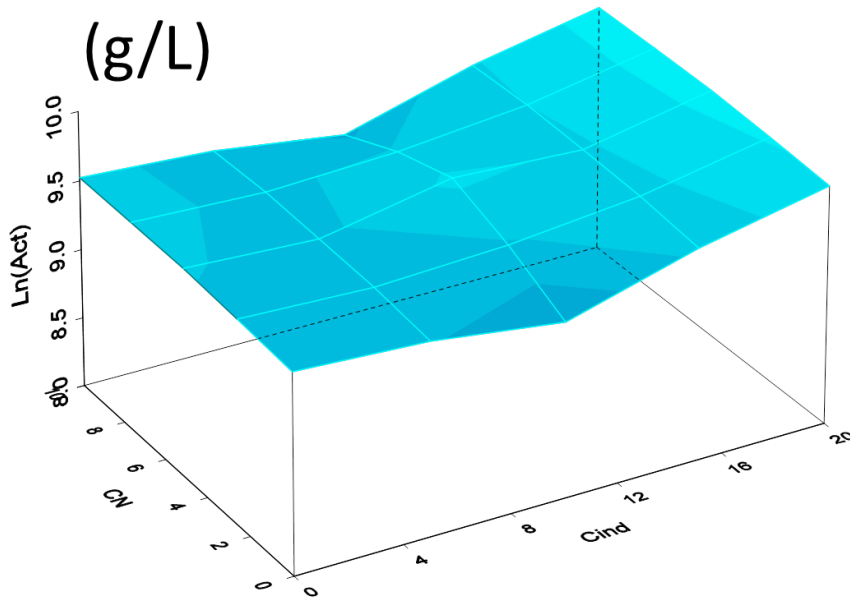
- Los nudos resultaron ser el mejor inductor y en la concentración de 5g/L que fue estadísticamente distinta de la de 10 y de 15.
- Los filtrados no se diferencian como inductores de la actividad



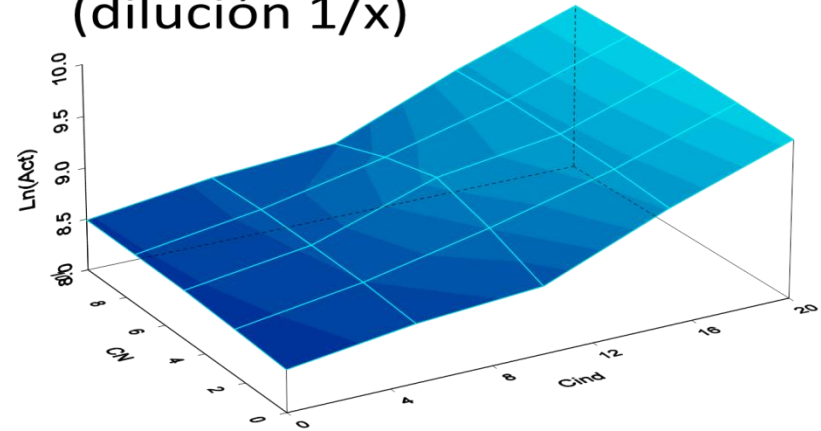
# Optimización de la producción de lacasas con las variables seleccionadas

Superficies de respuesta en las que se observa la actividad en función de la concentración de nitrógeno y la de inductor

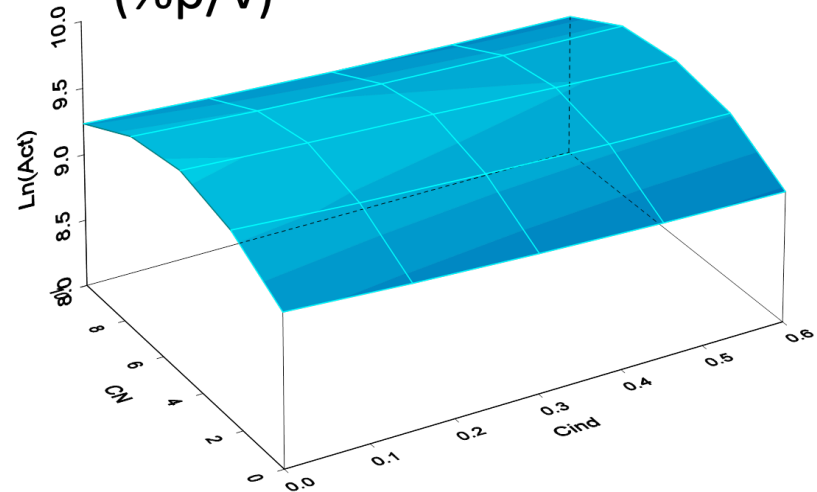
## Nudos *E. grandis* (g/L)

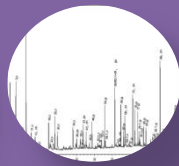


## Filtrados UPM Líquidos (dilución 1/x)



## Filtrados UPM Liofilizados (%p/v)



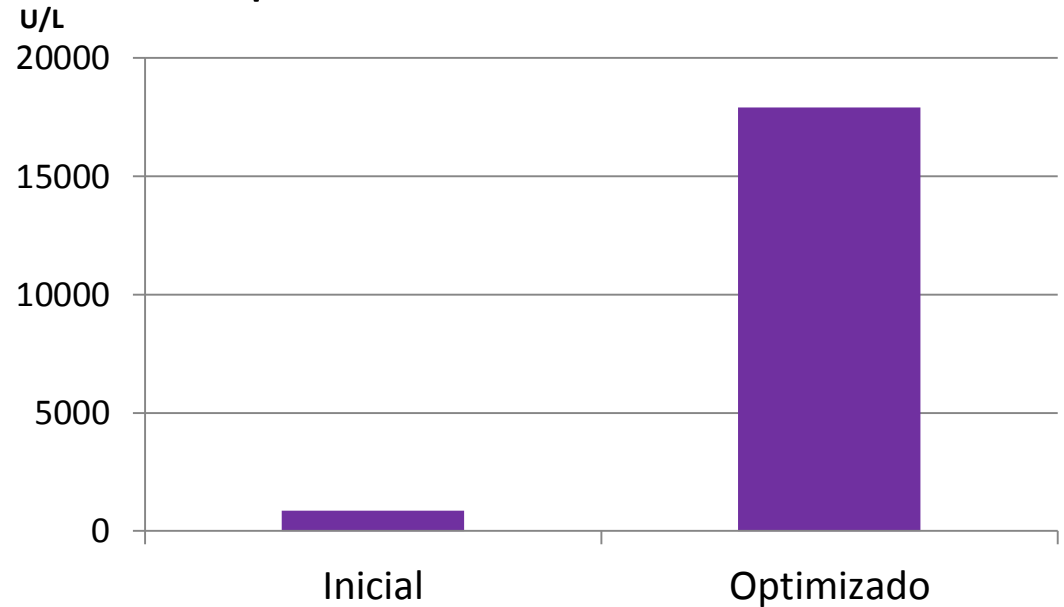


# Optimización de la producción de lacasas con las variables seleccionadas

Juntando todas las piezas

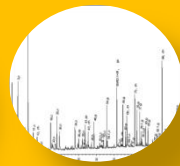


Optimización alcanzada:



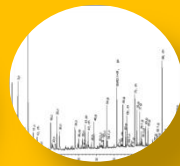
Componente	Compuesto	Concentración
Fase sólida	Madera <i>E. dunnii</i>	3 g en matraz de 250ml+ 0,5mM CuSO <sub>4</sub>
Inductor	Nudos <i>E. grandis</i>	20g/L
Fuente de nitrógeno	peptona	5,4g/L

**CONDICIONES OPTIMAS**



## Conclusiones

- Los filtrados de laboratorio (FCT) y se UPM se encuentra formados principalmente por compuestos provenientes de carbohidratos y lignina.
- Filtrados UPM poseen menor cantidad de productos de degradación de los carbohidratos que los FCT.
- En los filtrados industriales (UPM) se pudieron identificar sales de ácidos grasos.



## Conclusiones

- Los filtrados derivados de la industria papelerera, **no sirvieron** como inductores para la producción de lacasa, los nudos de Eucalyptus, sí
- De los 7 hongos estudiados se seleccionó uno, para la buena producción.
- Se partió de una actividad enzimática de 860U/L y se logró llegar en la optimización a 17908 U/L, **un valor de actividad lacasa 21 veces mayor.**



Q.F. Alejandra Galetta



Dra. Beatriz Vega



B.Q. Larissa Gioia



Q.F. Emiliana Botto



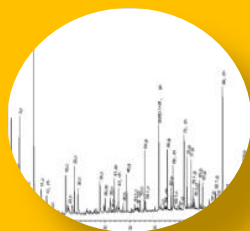
Q.F Victoria Giorgi



I.Q. Msc. Luis Reina



Gracias por su atención!!!





# Optimización de la producción de lacasas con las variables seleccionadas

## Obtención de un modelo de superficie de respuesta.

El Diseño Experimental con tres bloques, dos de 18 corridas y uno de 24. El diseño permite estimar una función cuadrática de los tres factores, inductor, concentración de N y concentración de C así como la interacción entre ellos. Cada variable se analizó en 5 niveles codificadas como -1.78, -1, 0, +1 y +1.78 en un total de 32 corridas.

$$Lact = \beta_0 + \beta_{1i} + \beta_{2i} * Cind(Ind) + \beta_3 * CN + \beta_4 * CN^2$$

**Ecuación 1** – Modelo final que muestra la actividad de lacasa con respecto a las variables estudiadas.

$b_0$ : Ordenada en el origen.

$b_{1i}$ : Efecto del inductor  $i$ ,  $i=1,2,3$

$b_{2i}$ : Coeficiente de regresión lineal de concentración del inductor para el inductor  $i$

$b_3$ : Coeficiente lineal para la concentración de peptona (N)

$b_4$ : Coeficiente cuadrático para la concentración de peptona (N)