

# Informe final publicable de proyecto

## Producción integrada de biobutanol y nanocelulosa a partir de eucalipto

Código de proyecto ANII: FMV\_1\_2019\_1\_156233

24/03/2023

**LAREO VARELA, Claudia** (Responsable Técnico - Científico)

**CEBREIROS SANSBERRO, Florencia** (Investigador)

**FERRARI VIDAL, Mario Daniel** (Investigador)

---

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE INGENIERÍA (Institución Proponente) \\  
FACULTAD DE INGENIERÍA. FUNDACIÓN JULIO RICALDONI

## Resumen del proyecto

El interés en la valorización de materiales lignocelulósicos ha incrementado en los últimos años e incluso la producción de biocombustibles avanzados y productos químicos.

La producción de biobutanol via fermentación a partir de estos materiales aún no es económicamente viable dado los elevados costos de procesamiento, debido fundamentalmente a los bajos rendimientos de sacarificación de la biomasa y al bajo rendimiento de producto atribuido a su toxicidad sobre el microorganismo. Para que la producción de biobutanol sea sostenible en el tiempo, debe integrarse a procesos y equipamientos de conversión de biomasa ya existentes, permitiendo la coproducción de compuestos de valor agregado que mejoren la economía global del proceso.

La nanocelulosa presenta varias aplicaciones potenciales en distintas áreas como ser fabricación de polímeros, dispositivos de almacenamiento de energía, incluso su uso en productos papeleros ha mostrado mejorar notoriamente sus propiedades.

En este proyecto, se evaluó la producción integrada de biobutanol y nanofibras de celulosa (CNF) a partir de pulpa de celulosa de eucalipto nacional mediante combinación de procesos enzimáticos, mecánicos y fermentativos. Esta estrategia de coproducción representa un proceso prometedor, incluso a nivel industrial, dado que representan productos de valor agregado atractivos para las industrias de pulpa y papel, que buscan diversificar su cartera de productos.

Mediante la combinación de tratamientos mecánicos y enzimáticos se logró obtener CNF a partir de pulpa de celulosa de eucalipto con un ancho de 4–14 nm y una relación de aspecto de 220–230, con propiedades atractivas para su aplicación en el sector papelerero. Se logró convertir azúcares de forma efectiva fermentables, producidos durante el pretratamiento enzimático de la materia prima, en biobutanol y coproductos utilizando microorganismos del género *Clostridium* capaces de metabolizar tanto glucosa como xilosa.

En este proyecto se demostró la factibilidad de coproducir CNF y biobutanol como productos de alto valor agregado a partir de pulpa de celulosa de eucalipto. Los resultados alcanzados en este proyecto sirven como punto de partida importante para futuros estudios sobre la coproducción de biomateriales y químicos de valor agregado en un concepto de biorrefinería forestal. Además, pretende contribuir al conocimiento de nuevas herramientas en la obtención de nanocelulosa y su potencial aplicación.

**Ingeniería y Tecnología / Biotecnología Industrial / Bioproductos, Biomateriales, Bioplásticos, Biocombustibles, Bioderivados, etc. / Biocombustibles, Biomateriales**

**Palabras clave: biorrefinería / biobutanol / celulosa /**

## Introducción

Los materiales lignocelulósicos provenientes del sector forestal son considerados una materia prima promisoría para la producción de biocombustibles y productos químicos debido al alto contenido de carbohidratos, bajo requerimientos de nutrientes y riego en general, no competitividad con los alimentos, y alto rendimiento agrícola. La producción de biocombustibles a partir de madera puede ser integrada a la producción de pulpa y papel, así como a la producción de otros productos dentro del concepto de biorrefinería, contribuyendo a la sustentabilidad de estas industrias mediante la diversificación de productos en función de la variabilidad de los mercados.

En los últimos años, los nanomateriales de celulosa (nanocelulosa) han mostrado ser un producto prometedor presentando varias aplicaciones potenciales en distintas áreas como ser fabricación de polímeros, dispositivos de almacenamiento de energía, modificadores de reología, hidrogeles, supercondensadores, biosensores y pantallas flexibles transparentes [1,2]. Dentro del término de nanocelulosa, se engloban las nanofibras de celulosa (CNF, del inglés cellulose nanofibers), los nanocristales de celulosa (CNC, del inglés cellulose nanocrystals) y la celulosa bacteriana (BC) [3,4]. Las CNF son aquellas fibras de celulosa que presentan diámetros en la escala nanométrica y longitudes que van hasta varios micrómetros, lo que les confiere una gran relación de aspecto (relación largo a diámetro) y superficie específica. A diferencia de los CNC, las CNF contienen regiones amorfas y cristalinas, lo que las hace mucho más flexibles que los CNC. La presencia de regiones amorfas en las CNF les permite crear redes tridimensionales y crear estructuras dimensionalmente estables. Además, las CNF tienen varias ventajas como elemento reforzante debido a su diámetro pequeño, elevada relación de aspecto, biocompatibilidad, posibilidad de funcionalización, así como elevados resistencia y módulo. Esto hace que sean un material atractivo para mejorar las propiedades de los productos forestales tradicionales (papel y embalaje) y otros

productos no tradicionales (cemento y hormigón prefabricado) [5]. Actualmente, las CNF se están convirtiendo en un material clave en la industrialización debido a sus propiedades mecánicas, ópticas y reológicas. La tendencia del mercado de la CNF apunta a un aumento en su producción, con una producción de 9.000 toneladas por año, y una facturación anual que podría llegar a 808,3 millones de dólares para el 2022 [6]. La primera planta piloto en producir CNF fue iniciada en 2011 por Innventia en Suecia, y su producción comercial se inició en 2012 [6]. Varios países como Canadá, Estados Unidos, Finlandia, Suecia, China, Japón han estado elaborando y desarrollando tecnología para su producción a gran escala [6,7]. Sin embargo, todavía se sigue investigando para encontrar su aplicación en los campos de hormigones, pinturas, composites y embalajes. Aunque las CNFs podrían estar disponibles comercialmente, se requiere mayor investigación en los métodos de preparación.

Tanto el proceso de obtención como el origen de la materia prima juega un papel fundamental en las características finales de los componentes celulósicos de los nanomateriales resultantes. El desarrollo de procesos para la producción de nanocelulosa ha tenido un fuerte crecimiento en los últimos años debido a sus propiedades únicas, su carácter renovable y gran disponibilidad [8]. Los nanomateriales de celulosa pueden ser producidos por procesos mecánicos, químicos, biológicos y la combinación de estos [4]. El método comúnmente utilizado para producir CNF es mediante desintegración mecánica (homogeneización, micro fluidización, cryocrushing, micromolienda). Si bien la desintegración mecánica representa un proceso fácilmente escalable y que puede operar de forma continua, la producción rentable de CNF mediante tratamiento fisicoquímico sigue siendo un reto debido a los elevados requisitos de energía en el proceso y la heterogeneidad del material obtenido [9,10]. Para reducir el consumo energético del proceso, se ha sugerido el uso de diversos pretratamientos químicos de la celulosa, como ser TEMPO-oxidación, carboximetilación y cationización [3]. Sin embargo, a pesar de que dichos procesos han resultado efectivos, demostraron ser relativamente caros, y preocupaciones por los posibles riesgos ambientales limitarían su uso a nivel industrial. Los tratamientos biológicos, particularmente el tratamiento enzimático, representa una vía emergente interesante para la producción de CNF, lo que implica condiciones menos severas y sin uso de químicos. Este enfoque ha recibido creciente interés dada la alta especificidad de sustrato de las enzimas y el bajo consumo energético asociado al proceso [7,11]. Dependiendo del tipo de enzima utilizada, tanto con actividad celulolítica (por ejemplo, enzima del tipo exoglucanasa, endoglucanasa y beta-glucosidasa) como xilanolítica, se tendrá liberación de azúcares fermentables (glucosa, xilosa) como consecuencia de la hidrólisis de los carbohidratos en la materia prima (principalmente celulosa y xilano) [12]. Dichos azúcares fermentables pueden ser recuperados en la corriente líquida separada luego del tratamiento enzimático, y pueden ser fermentados por microorganismos para la producción de otros compuestos de interés industrial. El residuo sólido resultante del tratamiento enzimático, el cual se compone de microfibras de celulosa, puede ser sometido a tratamiento mecánico para obtener las CNF. De esta manera se podría integrar procesos de coproducción de CNF y productos de valor agregado obtenidos a partir de los azúcares fermentables.

El butanol es un biocombustible alternativo atractivo ya que presenta propiedades superiores como combustible a las del etanol (mayor contenido energético, menor volatilidad, puede mezclarse fácilmente con gasolina en cualquier proporción, menos corrosivo e higroscópico, entre otros). Además, presenta varias aplicaciones en distintos sectores de la industria química como solvente o componente de formulación (tintas, pinturas, textiles, cosméticos, detergentes, productos farmacéuticos) [13,14]. El biobutanol se puede producir por fermentación microbiana mediante la fermentación llamada ABE, donde se produce una mezcla de solventes (acetona, butanol y etanol) o IBE (isopropanol, butanol, etanol). La fermentación ABE fue uno de los procesos de fermentación industrial más grandes en los años 1920-1980. Sin embargo, perdió competitividad debido al aumento en el costo de las materias primas utilizadas y el crecimiento de los procesos petroquímicos que resultaban más eficientes [13]. La demanda creciente por el uso de fuentes renovables de energía junto con los avances de la biotecnología ha generado nuevo interés en su producción, principalmente utilizando materiales lignocelulósicos [14-16]. El mercado mundial de n-butanol se estimó en US\$ 4,21 billones en 2017 y se proyecta que alcance US\$ 5,86 billones en 2025. Se utiliza principalmente en la producción de acrilato de butilo para resinas de recubrimiento para superficies, textiles, adhesivos y pinturas industriales. Algunas de las compañías más importantes son: BASF, Dow Chemical, Oxea Corporation, Formosa Plastics Corporation, SASOL, Petrochina Company, Eastman Chemical, Perstorp, Mitsubishi Chemical, Cobalt Technologies, OXO Corporation, KH Neochem Co. Ltd. Si bien los materiales lignocelulósicos provenientes del sector forestal representan una materia prima atractiva, la producción de biobutanol celulósico no sería económicamente viable dado los elevados costos de procesamiento, bajos rendimientos de sacarificación, bajo rendimiento de producto y toxicidad del microorganismo [17-19]. Para que la producción de butanol a partir de estos materiales sea sostenible en el tiempo, debe integrarse a procesos y equipamientos de conversión de biomasa ya existentes, conforme al concepto de biorrefinería.

Este proyecto evaluó la integración de los procesos de producción de nanocelulosa y biobutanol mediante la producción de CNF a partir de pulpa de celulosa de eucalipto mediante tratamiento enzimático, y el aprovechamiento de los azúcares liberados por hidrólisis de los carbohidratos para producir biobutanol mediante fermentación. Esta estrategia de coproducción atiende a un completo aprovechamiento de la materia prima mediante la producción paralela de múltiples productos, productos de bajo valor en cantidad mayor, y productos químicos de mayor valor en menor cantidad. La coproducción de CNF y biobutanol contribuiría a la sustentabilidad de las industrias de pulpa y papel y de biocombustibles, mediante la diversificación de productos en función de la variabilidad de los mercados.

### **Metodología/diseño del estudio**

La estrategia de investigación se basó en el estudio de la producción de nanofibras de celulosa (CNF, del inglés cellulose nanofibers) a partir de pulpa de celulosa de eucalipto mediante tratamiento enzimático y posterior tratamiento mecánico.

Además, se evaluó la fermentabilidad de los azúcares producidos como subproducto del tratamiento enzimático de la pulpa de celulosa para la producción de biobutanol. De esta manera, se pretendió evaluar la integración de los procesos de producción de CNF y biobutanol valorizando la corriente de azúcares fermentables obtenida como subproducto, atendiendo al máximo aprovechamiento de la materia prima y sus componentes principales.

Se plantearon dos hipótesis de trabajo: la primera es que el tratamiento enzimático de la pulpa de eucalipto mejoraría la extracción de CNF durante el tratamiento mecánico, reduciendo de esta manera los consumos energéticos durante el tratamiento mecánico asociados al proceso de obtención de CNF; y la segunda hipótesis consiste en que la integración de los procesos de producción de CNF y biobutanol conducen a una propuesta viable desde el punto de vista técnico, mediante un completo uso y aprovechamiento de la materia prima utilizada.

La pulpa de celulosa utilizada como materia prima fue provista por la planta local de pulpa UPM Fray Bentos y correspondió a hojas de pulpa de eucalipto Kraft blanqueada (PEKB). Las hojas fueron resuspendidas en agua destilada utilizando un desintegrador de laboratorio y almacenadas a 4°C con una humedad de aproximadamente 85% hasta su uso. Previo a los ensayos de pretratamiento, se realizó su caracterización fisicoquímica siguiendo protocolos estandarizados para la determinación de: composición química (contenido de glucano, xilano y lignina), tamaño promedio de las microfibras, grupos ácidos carboxílico, accesibilidad de la celulosa, grado de polimerización, grado de cristalinidad, y descomposición térmica del material [20].

Se evaluó el pretratamiento enzimático de la PEEKB empleando dos preparaciones enzimáticas comerciales de celulasas: el complejo Cellic CTec3 (Novozyme), y la enzima monocomponente endo-1,4-beta-D-glucanasa de *Aspergillus niger* (Megazyme Ltd.). Se realizaron diseños experimentales para evaluar los efectos de las variables concentración de sólidos, dosis de enzima y tiempo de reacción en la producción de CNF y en la liberación de azúcares como consecuencia de la hidrólisis enzimática de los carbohidratos (celulosa, xilano) presentes en la PEEKB. Los ensayos se realizaron en escala laboratorio, utilizando matraces con agitación orbital. Una vez seleccionadas las mejores condiciones operativas, se evaluó el efecto del agregado del complejo enzimático comercial de xilanasa Cellic HTec (Novozyme) y Swollenin en la extracción de CNF durante el posterior tratamiento mecánico. Debido a que la conversión de carbohidratos durante el pretratamiento enzimático resultó significativa cuando se trabajó con complejos enzimáticos, se evaluó aumentar la concentración de sólidos de forma tal de obtener una fracción líquida más concentrada en azúcares fermentables para ser posterior conversión a butanol. Se realizó caracterización fisicoquímica de las fracciones sólidas (pulpa pretratada enzimáticamente) siguiendo los mismos protocolos utilizados para la caracterización de la materia prima. En las fracciones líquidas (hidrolizado enzimáticos) obtenidas se cuantificó por cromatografía en fase líquida (HPLC) las concentraciones de azúcares solubles (glucosa y xilosa).

Se estudiaron tres tratamientos mecánicos para la extracción de CNF: ultrasonificación, molienda con bolas y homogeneización a alta velocidad (Ultraturrax). Se evaluó el efecto de diferentes condiciones operativas sobre el rendimiento de extracción y propiedades de CNF en cada tratamiento mecánico. En el tratamiento de ultrasonificación se trabajó con tiempos de tratamiento entre 30-120 min, amplitud de ultrasonificación de 50-90% y consistencia de la mezcla en el rango 0.07-0.5% p/p. En el tratamiento de molienda de bolas se estudiaron distintas cargas de bolas, velocidades de rotación y tiempos de tratamiento. En este tratamiento, se realizó un diseño preliminar de experimentos para evaluar el efecto de las variables carga de bolas (40, 80, 120, 160 y 200 gbolas/gsólido) y tiempo de molienda (90 min y 180 min) sobre

la extracción de CNF. Estos ensayos se realizaron a la frecuencia de molienda máxima (20 Hz) y utilizando bolas de 0.5 mm y 3 mm en proporción másica 7:3. En estos ensayos se determinó la extracción de CNF de forma indirecta mediante ensayos de sedimentación para estudiar la estabilidad de las suspensiones de CNF, y mediante ensayos de granulometría para estudiar la reducción de tamaño del material durante la molienda. En base a los resultados obtenidos, se realizó un diseño experimental para estudiar el efecto de la carga de bolas (80, 120, 160 y 200 g/g y tiempos de tratamiento (15, 30 y 45 min) a 20 Hz sobre la extracción y propiedades de CNF obtenidas.

En el tratamiento con Ultraturrax se estudió el efecto de la velocidad de agitación y tiempo sobre los rendimientos de extracción de CNF. Se realizaron ensayos para evaluar el efecto de la variable tiempo (30, 60, 90, 120 y 240 min), trabajando con una velocidad de 16.000 rpm. No se trabajó con velocidades mayores a 16.000 rpm por problemas de sobrecalentamiento de la mezcla.

Se evaluaron propiedades de CNF obtenidas mediante los diferentes tratamientos mecánicos siguiendo protocolos estandarizados para determinación de: estabilidad coloidal, relación de aspecto, distribución de diámetro, distribución de tamaño promedio, descomposición térmica [20]. Se realizaron análisis microscópicos de CNF mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM).

Se evaluó la fermentabilidad de los hidrolizados enzimáticos obtenidos luego del pretratamiento enzimático de la PEKB para la producción de butanol. Para ello se evaluaron los microorganismos *Clostridium beijerinckii* DSM 6422 (productor ABE) y *Clostridium beijerinckii* DSM 6423 (productor IBE) obtenidos de la colección de microorganismos DSMZ (Leibniz, Alemania). Una de las ventajas importantes de estas cepas es su capacidad para metabolizar simultáneamente hexosas y pentosas, lo cual las convierte en cepas promisorias para la fermentación de hidrolizados derivados de materiales lignocelulósicos. En primera instancia, se evaluó el desempeño de ambas cepas en medios semi-sintéticos usando mezclas de glucosa y xilosa como fuente de carbono, en proporciones comparables con las encontradas en los hidrolizados enzimáticos (37 g/L glucosa:13 g/L xilosa; 26 g/L glucosa:9 g/L xilosa; y 15 g/L glucosa:5 g/L xilosa). Estos ensayos se realizaron con el objetivo de determinar si las cepas eran capaces de metabolizar ambos azúcares y producir butanol, además de determinar los rendimientos de producción y productividad.

Los ensayos se realizaron en escala laboratorio en condiciones anaerobias utilizando botellas (100 mL) cerradas herméticamente, con agitación orbital, trabajando con concentración inicial de azúcares en el rango de 20-50 g/L. Seguidamente, se realizaron ensayos de fermentación con los hidrolizados enzimáticos con el objetivo de estudiar su posible aprovechamiento para la producción de butanol. Tanto los medios semi-sintéticos como los hidrolizados enzimáticos se suplementaron con extracto de levadura, vitaminas y minerales. Se realizó seguimiento de la fermentación mediante cuantificación de azúcares, productos, biomasa, y movilidad y morfología celular. La concentración de butanol, acetona, etanol, isopropanol, ácidos acético y butírico se determinó por cromatografía de gases (GC). Se seleccionó la mejor condición de trabajo en base a concentración, rendimiento, y productividad de butanol y coproductos de valor agregado (acetona, isopropanol).

Finalmente, se determinó una posible estrategia para coproducir butanol y CNF a partir de PEKB realizando balance de materiales luego de cada una de las etapas y calculando rendimiento de producto para las diferentes fracciones.

## **Resultados, análisis y discusión**

### **1) Caracterización de la materia prima**

La PEKB resultó una materia prima promisorio para producir nanocelulosa debido a su alto contenido de celulosa (77%) y bajo contenido de lignina (<1%). Además, presentó un contenido de hemicelulosa (mayoritariamente xilano) relativamente elevado (18%).

### **2) Tratamiento enzimático de PEKB**

Las dos preparaciones enzimáticas utilizadas (celulasas Cellic CTec3 y endoglucanasa (EG)) resultaron efectivas para mejorar la accesibilidad de la celulosa. Además, el uso de proteínas auxiliares catalíticas (complejo de xilanasas Cellic HTec) y/o no catalíticas (Swollenin, proteína con actividad tipo expansina) permitió mejorar la accesibilidad de la celulosa, mediante la apertura de las fibras de celulosa debido a dos efectos: i) hidrólisis de la hemicelulosa (mayoritariamente xilano) debido a la actividad xilanolítica de los complejos enzimáticos; ii) ruptura de los puentes de hidrógeno entre fibras

de celulosa y con la hemicelulosa, lo cual favorece la apertura de las fibras y por ende el acceso de las enzimas a la celulosa para su hidrólisis.

Los porcentajes de hidrólisis alcanzados empleando las preparaciones Cellic CTec3 y HTec resultaron elevados (hasta 56% celulosa y 82% xilano). Se obtuvieron fracciones líquidas ricas en azúcares (20-40 g/L glucosa, 6-13 g/L xilosa) que fueron fermentadas a biobutanol. Además, se redujo el grado de polimerización de la PEKB en 50-75%, lo cual implica un significativo acortamiento de la longitud de las cadenas de celulosa y disminución de la distribución del peso molecular. También, se alcanzaron mejoras de hasta 50% en la accesibilidad de la celulosa comparado con el material original.

Los porcentajes de hidrólisis alcanzados empleando EG resultaron casi despreciables (< 5%), lo cual permite maximizar los rendimientos de producción de CNF a partir de PEKB. Las fracciones líquidas contenían concentraciones muy bajas de azúcares (< 1 g/L), por lo que no se utilizaron para ensayos de fermentación. Se obtuvo una reducción en el grado de polimerización de PEKB de aprox. 30%, menor al alcanzado con celulasas CTec3. Esto implica que hubo un acortamiento de las cadenas de celulosa y distribución del peso molecular durante el tratamiento enzimático con EG. Además, se encontró que este tratamiento mejora la accesibilidad de la celulosa en 30-40%.

### 3) Tratamiento mecánico de ultrasonificación

Este tratamiento resultó efectivo para la fibrilación de la PEKB pretratada enzimáticamente (PEKB-PE) alcanzándose rendimientos de CNF del 61-93%, lo que indica que la cavitación por fuerzas hidrodinámicas de ultrasonido fue efectiva para abrir la estructura de las microfibras de celulosa, liberando las nanofibrillas de la pared célula. La amplitud de ultrasonificación resultó ser la variable más significativa en la producción de CNF. Se obtuvo un rendimiento de CNF relativamente alto (33%) para PEKB sin pretratamiento enzimático a la intensidad de ultrasonificación más alta, lo que demuestra la eficiencia del proceso de ultrasonificación. Sin embargo, cabe mencionar que la pulpa de eucalipto presenta fibras más cortas que otros materiales leñosos (como pulpa de Pinus), facilitando su desintegración. Se realizó una completa caracterización fisicoquímica (transmitancia, cristalinidad y descomposición térmica) y microscópica de las suspensiones de CNF obtenidas. Se estimó la longitud de las CNF obtenidas en aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  y diámetros de 5-15 nm, valores esperados de acuerdo con la literatura consultada.

### 4) Tratamiento mecánico de molienda de bolas

Este tratamiento permite trabajar con consistencias de muestras mayores (1% p/p) que la ultrasonificación (0.3% p/p), y por lo tanto, obtener suspensiones de CNF en mayor concentración.

Los ensayos de sedimentación de estudios preliminares mostraron menor estabilidad de las suspensiones al aumentar la carga de bolas de 40 g/g a 80 g/g y 120 g/g y el tiempo de molienda. Por otra parte, los ensayos de granulometría mostraron una mayor reducción en el tamaño del material al aumentar la carga de bolas y el tiempo de molienda, alcanzándose tamaños promedio del orden nanométrico ( $531 \pm 93$  nm) para cargas de bolas entre 80 g/g y 120 g/g (usando 40 g/g no se encontraba en escala nanométrica,  $4.9 \pm 0.8$   $\mu\text{m}$ ). Debido a esto, se continuó trabajando con una carga mínima de 80 g/g, estudiando tiempos de molienda más cortos (15-45 min). Paralelamente, se analizó el grado de contaminación de las suspensiones de CNF luego de la molienda mediante medidas de pérdidas por ignición (1000°C, 1 h) para determinar presencia de contaminantes inorgánicos aportados por las bolas y/o el contenedor de molienda. La contaminación aumentó con el tiempo de molienda y la carga de bolas, alcanzando un máximo de 7 mg/g suspensión y fue considerada como ZrO<sub>2</sub>. La presencia de contaminación podría explicar la menor estabilidad de las suspensiones de CNF obtenida para cargas de bolas y tiempos de molienda mayores.

Se obtuvo un rendimiento máximo de extracción de CNF ( $30 \pm 5\%$ ) para todas las condiciones de carga de bolas (80, 120, 160 y 200 g/g) luego de 30 min a 20 Hz. El aumento del tiempo de molienda hasta 3 h no mejoró el rendimiento de extracción. Si bien se había observado una reducción del tamaño promedio del material al aumentar la carga de bolas y el tiempo de molienda en los ensayos preliminares, no se observó un aumento en los rendimientos de extracción de CNF. De acuerdo con estos resultados, se plantea la hipótesis de que las propiedades reológicas, particularmente viscosidad, de las suspensiones de CNF obtenidas estarían perjudicando la extracción completa de CNF por molienda [21].

Dado que con una carga de bolas de 80 g/g se alcanzó ese rendimiento de extracción de CNF en menor tiempo (15 min), se continuó trabajando con esta carga. Paralelamente, se hicieron moliendas en las mismas condiciones de carga de bolas (80-200 g/g) y tiempo de molienda (1.5 h), pero a menor frecuencia (10 Hz). Los rendimientos de CNF fueron menores en todas las condiciones, alcanzándose una reducción de hasta 33%.

Para maximizar el rendimiento de CNF y minimizar la contaminación durante la molienda, se trabajó con la menor cantidad de bolas y el menor tiempo de molienda posible (80 g/g, 30 min, 20 Hz).

Finalmente, se realizó la molienda en forma secuencial, que permitió alcanzar un rendimiento de extracción de aprox. 50% luego de 5 etapas bajo las siguientes condiciones: carga de bolas 80 g/g, tiempo 30 min y frecuencia 20 Hz. Se realizó caracterización morfológica y fisicoquímica de las suspensiones de CNF. La molienda de bolas permitió obtener CNF de diámetros 4-14 nm y relaciones de aspecto 220-230.

#### 5) Tratamiento mecánico con Ultraturrax

Como tratamiento mecánico alternativo se evaluó la homogenización a alta velocidad con Ultraturrax. Al igual que la molienda de bolas, permite trabajar con consistencias de muestras relativamente altas (1% p/p). Se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con la molienda de bolas. Luego de 30 min de tratamiento, no se observó un incremento significativo en los rendimientos de extracción. Se alcanzó un rendimiento máximo de  $(44 \pm 2\%)$  luego de 60 min. Una de las ventajas de este tratamiento frente al de molienda es la posibilidad de obtener una suspensión de CNF concentrada (1% p/p). En la molienda se debe diluir la preparación final para separar las bolas de la suspensión, lo cual lleva a obtener suspensiones finales de 0.2% (p/p). Como trabajo futuro se propone evaluar el tratamiento secuencial, de modo de lograr una nanofibrilación completa.

#### 6) Producción de butanol por fermentación ABE/IBE

En medios semi-sintéticos con contenido de glucosa y xilosa similar al encontrado en los hidrolizados enzimáticos y concentraciones de azúcares totales bajas (20 g/L), las dos cepas consumieron completamente la glucosa a las 24 h, mientras que sólo *C. beijerinckii* DSM 6423 fue capaz de consumir xilosa completamente luego de 48 h. Para concentraciones de azúcares mayores (hasta 50 g/L), la conversión de azúcares fue menor (73-87% glucosa, 31-44% xilosa) posiblemente atribuido a concentraciones de butanol inhibitorias para las cepas (5-8 g/L). Si bien los rendimientos de producción de butanol resultaron menores para la cepa IBE (0.16 g/g) frente a la ABE (0.19 g/g), se decidió continuar trabajando con *C. beijerinckii* DSM 6423, debido a la ventaja de producir isopropanol en lugar de acetona que es corrosiva.

En los hidrolizados enzimáticos de la PEKB con CTec3 y HTec, se observó que *C. beijerinckii* DSM 6422 consumió casi completamente la glucosa y la xilosa dentro de las 24-48 h. En hidrolizados con 20 a 35 g/L de azúcares totales iniciales, el consumo fue completo a las 24 h, mientras que hidrolizados con 50 g/L requirieron 48 h. Se obtuvo 8.9 g/L butanol y 14 g/L ABE en estas condiciones. El consumo de glucosa y de xilosa fue de hasta 100% y 96% respectivamente para todas las condiciones evaluadas, valores mayores que los encontrados en los medios semi-sintéticos (87-100% para glucosa, 31-78% para xilosa). La mayor concentración de acetato en los hidrolizados podría haber mejorado el rendimiento de la fermentación (hasta 4 g/L y 2.5 g/L en el hidrolizado y medio semi-sintético respectivamente), debido al buffer de acetato utilizado durante el pretratamiento enzimático (0.20-0.21 g/g) [22].

Para la fermentación IBE se observó la misma tendencia, mayor concentración de azúcares iniciales, mayor concentración de butanol alcanzada. Se obtuvo una concentración máxima de 6.9 g/L de butanol y 5.5 g/L de isopropanol (12 g/L IBE) después de 48 h con una concentración inicial de azúcares de 46 g/L. Sin embargo, la conversión de azúcares fue casi completa (92-100% de glucosa y 81-100% de xilosa) con una concentración inicial de azúcares baja (20-28 g/L). Para concentraciones de azúcares mayores (40-50 g/L), la conversión de glucosa y xilosa fue 77-81% y 55-56% respectivamente. También en este caso se obtuvieron mayores conversiones de azúcares en el hidrolizado enzimático que en los medios semi-sintéticos, obteniéndose rendimientos de butanol de 0.20-0.21 g/g.

#### 7) Coproducción de CNF y biobutanol

A partir de 100 kg de PEKB hidrolizado enzimáticamente con enzimas CTec3 y HTec y posteriormente tratado con molino de bolas, se pudo recuperar 39.2 kg de CNF, y 19 kg de ABE (62% p/p butanol y 35% p/p acetona) o 15 kg de IBE (57% p/p butanol y 40% p/p isopropanol) dependiendo de la cepa utilizada [20]. Estos rendimientos obtenidos son similares o superiores a los reportadas por otros autores usando tanto celulosa como hemicelulosa para distintos materiales lignocelulósicos [23-26].

#### 8) Potenciales aplicaciones de CNF

Las CNF presentan gran potencial de aplicación en diversos sectores, debido a su naturaleza renovable, biodegradable, elevadas prestaciones y capacidad de funcionalización. Uno de los mercados con más proyección es el de papelerero [27]. El agregado de CNF en la masa del papel mejora las propiedades mecánicas (resistencia y longitud de rotura) de las fibras

sin causarle daños estructurales, como puede ocurrir cuando se utilizan técnicas convencionales de refinado mecánico. Otra forma de incorporar las CNF en la fabricación de papel es mediante su adición en superficie. Se trata de un tratamiento posterior a la formación del papel y cuyas propiedades mecánicas resultantes incrementan en función de la morfología de las CNF. La adición de CNF al papel permite brindar propiedades especiales del tipo de barrera y/o superficiales, que permiten por ejemplo, impedir a algunos gases o líquidos penetrar en el seno del papel [28].

Otra potencial aplicación es la fabricación de nanopapel, producido mediante filtración de una suspensión de CNF, lo cual da lugar a básicamente una membrana de CNF con interesantes propiedades físico-mecánicas [29]. Dichas membranas resultan más sostenibles que los filmes producidos de plástico. Una de las desventajas de las CNF producidas mediante tratamiento enzimático comparado con el tratamiento químico (TEMPO, por ejemplo) es la menor transparencia, por lo que su aplicación en aparatos optoelectrónicos y fotovoltaicos, e incluso en pantallas flexibles, sería limitada [30].

Con el objetivo de evaluar posibles aplicaciones de las CNF obtenidas en este proyecto, se propone como trabajo futuro evaluar el efecto del agregado de estas CNF a pasta de celulosa cruda para la obtención de papel. De la misma manera, se propone evaluar la formación de nanopapeles utilizando suspensiones de CNF producidas mediante tratamiento enzimático combinado con mecánico. Estos nanopapeles se producirán mediante filtración de las suspensiones de CNF obtenidas, dando lugar a membranas con determinadas propiedades físico-mecánicas.

## **Conclusiones y recomendaciones**

La pulpa de celulosa de eucalipto utilizada como materia prima resultó promisorio para la producción de nanofibras de celulosa (CNF) debido a su alto contenido de celulosa y bajo contenido de lignina.

El tratamiento enzimático empleando tanto complejos enzimáticos de celulasas como la enzima endoglucanasa monocomponente resultó efectivo para mejorar la accesibilidad de la celulosa en la pulpa de eucalipto para su posterior tratamiento mecánico. El agregado de proteínas auxiliares, ya sea con propiedades catalíticas o no catalíticas, al cocktail enzimático permitió trabajar con cargas de celulasas menores y alcanzar resultados comparables en términos de accesibilidad de la celulosa, depolimerización y reducción de tamaño de fibra promedio a los alcanzados empleando únicamente celulasas.

A diferencia del tratamiento enzimático con endoglucanasa, cuando se trabaja con complejos enzimáticos de celulasas y xilanasas, la depolimerización e hidrólisis de los polímeros celulosa y hemicelulosa (principalmente xilano) se da en mayor extensión, lo cual provoca una significativa liberación de azúcares solubles. Con el objetivo de lograr un mayor aprovechamiento de la materia prima, dichos azúcares solubles fermentables pueden ser fácilmente recuperados en una fracción líquida y convertidos en productos de mayor valor agregado mediante fermentación. En este trabajo, se logró de forma efectiva convertir estos azúcares en biobutanol y coproductos utilizando microorganismos del género *Clostridium* capaces de metabolizar tanto glucosa como xilosa.

Se lograron extraer CNF con propiedades interesantes para su aplicación en el sector papelerero mediante los tres tratamientos mecánicos estudiados. El tratamiento de ultrasonificación permitió alcanzar una nanofibrilación completa (con rendimientos mayores al 95%) de las microfibras de celulosa obtenidas luego del pretratamiento enzimático de la materia prima. Por otra parte, los tratamientos mecánicos de molienda de bolas y Ultraturrax resultaron prometedores para la extracción de CNF a partir de pulpa de celulosa de eucalipto, si bien se deben evaluar otras estrategias de operación, como por ejemplo una modalidad secuencial (en etapas), para lograr una nanofibrilación completa del material de partida. Una gran ventaja de estos dos tratamientos frente al tratamiento de ultrasonificación es la capacidad de obtener suspensiones de CNF de mayor consistencia. Sin embargo, todos los tratamientos mecánicos combinados con un pretratamiento enzimático permitieron obtener CNF con un ancho de 4–14 nm y una relación de aspecto de 220–230. Las diferencias obtenidas en la distribución del tamaño de CNF demuestran que las condiciones del pretratamiento enzimático, como ser la concentración de sólidos y el tiempo de reacción, influyen en la fragmentación y/o fibrilación de la fibra a través de alteraciones en la estructura de la fibra.

En este proyecto se demostró la factibilidad de coproducir CNF y biobutanol como productos de alto valor agregado a partir de pulpa de celulosa de eucalipto. Se alcanzaron rendimientos de producción de biobutanol y coproductos de 15-19 kg por 100 kg de materia prima procesada (mezcla conteniendo 57-62% p/p de butanol), y rendimiento de extracción de CNF de 39 kg por 100 kg de materia prima procesada.

El trabajo desarrollado en este proyecto sirve como un punto de partida importante para futuros estudios sobre la



coproducción de biomateriales y químicos de valor agregado en un concepto de biorrefinería forestal. Se propone evaluar aplicaciones de la CNF producida, particularmente en el sector papelero.

## Referencias bibliográficas

- [1] Abitbol T., Rivkin A., Cao Y., Nevo Y., Abraham E., Ben-Shalom T., Lapidot S., Shoseyov O., 2016. Nanocellulose, a tiny fiber with huge applications. *Current Opinion in Biotechnology* 39, 76-88.
- [2] Lou L., Osemwegie O., Ramkumar S. S., 2020. Functional nanofibers and their applications. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 59(13), 5439-5455.
- [3] Thomas B., Raj M.C., Joy J., Moores A., Drisko G.L., Sanchez C., 2018. Nanocellulose, a versatile green platform: from biosources to materials and their applications. *Chemical Reviews* 118(24), 11575-11625.
- [4] Pires J.R., Souza V.G., Fernando A.L., 2019. Valorization of energy crops as a source for nanocellulose production—current knowledge and future prospects. *Industrial Crops and Products* 140, 111642.
- [5] Shatkin J.A., Wegner T.H., Bilek E.M., Cowie J., 2014. Market projections of cellulose nanomaterial enabled products- Part 1: Applications. *Tappi J.* 13(5), 9–16.
- [6] Rajinipriya M., Nagalakshmaiah M., Robert M., Elkoun S., 2018. Importance of agricultural and industrial waste in the field of nanocellulose and recent industrial developments of wood based nanocellulose: a review. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6, 2807-2828.
- [7] Ribeiro R.S., Pohlmann B.C., Calado V., Bojorge N., Pereira Jr N., 2019. Production of nanocellulose by enzymatic hydrolysis: Trends and challenges. *Engineering in Life Sciences* 19(4), 279-291.
- [8] Cowie, J; Bilek, EM; Wegner, TH; Shatkin, JA. Market projections of cellulose nanomaterial enabled products -Part 2: Volume estimates. *Tappi Journal* 2014, 13, 57-69.
- [9] Brinchi L., Cotana F., Fortunati E., Kenny J.M., 2013. Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: technology and applications. *Carbohydrate Polymers* 94, 154–169.
- [10] Mohammadinejad R., Karimi S., Irvani S., Varma R.S., 2016. Plant-derived nanostructures: types and applications. *Green Chemistry* 18, 20–52.
- [11] Michelin M., Gomes D.G., Romani A., Polizeli M.D.L., Teixeira J.A., 2020. Nanocellulose production: exploring the enzymatic route and residues of pulp and paper industry. *Molecules* 25(15), 3411.
- [12] Cebreiros F., Seiler S., Dalli S.S., Lareo C., Saddler J., 2021a. Enhancing cellulose nanofibrillation of eucalyptus Kraft pulp by combining enzymatic and mechanical pretreatments. *Cellulose* 28(1), 189-206.
- [13] Kumar, M., Gayen, K., 2011. Developments in biobutanol production: New insights. *Applied Energy* 88:1999-2012.
- [14] Lee, S.Y., Park, J.H., Jang, S.H., Nielsen, L.K., Kim J., Jung, K.S., 2008. Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering* 101:209-228.
- [15] Gottumukkala, L.D., Haigh, K., Görgens, J., 2017. Trends and advances in conversion of lignocellulosic biomass to biobutanol: Microbes, bioprocesses and industrial viability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 76:963-973.
- [16] Algayyima, S.J.M., Wandel, A.P., Yusaf, T., Hamawand, I., 2018. Production and application of ABE as a biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 82:1195-1214.
- [17] Aden, A., Ruth, M., Ibsen, K., Jechura, J., Neeves, K., Sheehan, J., Wallace, B., Montague, L., Slayton, A., Lucas, J., 2002. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. Technical Report NREL/ TP-510-32438, National Renewable Energy Laboratory.
- [18] Himmel, M.E., Ding, S.Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D., 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels productin. *Science* 315:804–807.
- [19] Zhu, J.Y., Pan, X., Zalesny, R.S., 2010. Pretreatment of woody biomass for biofuel production: energy efficiency, technologies, and recalcitrance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87:847–857.
- [20] Cebreiros, F., Sánchez, G., Ferrari, M. D., Lareo, C. (2022). Integrating the coproduction of cellulose nanofibers and biobutanol from eucalyptus pulp using an environmentally friendly process. *Industrial Crops and Products*, 188, 115732.
- [21] Osorio, A. M., Bustamante, M. O., Restrepo, G. M., M. López, M. M., & Menéndez-Aguado, J. M. (2019). A Study of the Effect of Medium Viscosity on Breakage Parameters for Wet Grinding. *Symmetry*, 11(10), 1202.
- [22] Cebreiros, F., Risso, F., Cagno, M., Cabrera, M. N., Rochón, E., Jauregui, G., Boix, E., Bothig, S., Ferrari, M.D., Lareo, C., 2021b. Enhanced production of butanol and xylosaccharides from *Eucalyptus grandis* wood using steam explosion in a semi-continuous pre-pilot reactor. *Fuel*, 290, 119818.
- [23] Bondancia, T.J., Mattoso, L.H.C., Marconcini, J.M., Farinas, C.S., 2017. A new approach to obtain cellulose nanocrystals and ethanol from eucalyptus cellulose pulp via the biochemical pathway. *Biotechnol. Prog.* 33 (4), 1085–1095.
- [24] Du, L., Wang, J., Zhang, Y., Qi, C., Wolcott, M.P., Yu, Z., 2017. A co-production of sugars, lignosulfonates, cellulose, and cellulose nanocrystals from ball-milled woods. *Bioresour. Technol.* 238, 254–262.

- [25] Pereira, B., Marcondes, W.F., Carvalho, W., Arantes, V., 2021. High yield biorefinery products from sugarcane bagasse: Prebiotic xylooligosaccharides, cellulosic ethanol, cellulose nanofibrils and lignin nanoparticles. *Bioresour. Technol.* 342, 125970.
- [26] Wang, J., Chae, M., Beyene, D., Sauvageau, D., Bressler, D.C., 2021. Co-production of ethanol and cellulose nanocrystals through self-cycling fermentation of wood pulp hydrolysate. *Bioresour. Technol.* 330, 124969.
- [27] Future Markets Inc. *The Global Market for Nanocellulose.* 2015;(March):22.
- [28] Tarrés, Q., Saguer, E., Pèlach, M. A., Alcalà, M., Delgado-Aguilar, M., Mutjé, P., 2016. The feasibility of incorporating cellulose micro/nanofibers in papermaking processes: the relevance of enzymatic hydrolysis. *Cellulose*, 23(2), 1433-1445.
- [29] Henriksson M, Henriksson G, Berglund L a., Lindström T., 2007. An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers. *Eur Polym J.* 43(8):3434–41.
- [30] Tarrés, Q., Boufi, S., Mutjé, P., Delgado-Aguilar, M., 2017. Enzymatically hydrolyzed and TEMPO-oxidized cellulose nanofibers for the production of nanopapers: morphological, optical, thermal and mechanical properties. *Cellulose*, 24(9), 3943-3954.

## **Licenciamiento**

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)