



SCREENING DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL DE BASE CELULÓSICA

Carboni, Victoria

Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas-UNL
Director: Comelli, Raúl

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Bioetanol, Inhibidores, Screening

INTRODUCCIÓN

Los biocombustibles son capaces de sustituir parcialmente el consumo de combustibles fósiles tradicionales (petróleo y carbón), constituyen una fuente de energía renovable y tienen bajo impacto ambiental. Uno de los biocombustibles más importantes es el bioetanol. El corte actual de naftas (12%) es posible gracias a la capacidad de producción de etanol a partir de caña de azúcar y, principalmente, de maíz, mientras que se pretende llegar a un corte del 20% o superior para el año 2030. Esta situación requiere un incremento del área sembrada y de la capacidad productiva de las tierras, lo que origina elevadas demandas sobre los recursos naturales y competencia por la tierra que puede ser utilizada para la producción de alimentos. En este contexto energético, los residuos agroindustriales de base celulósica emergen como potencial fuente alternativa y muy atractiva para la producción sustentable de bioetanol. Durante la etapa de acondicionamiento del material, se liberan compuestos inhibidores capaces de afectar el metabolismo de los microorganismos productores del mismo, las levaduras, que constituye uno de los desafíos actuales para el desarrollo de bioprocesos robustos. En el presente trabajo se estudia el desempeño de diferentes cepas de levaduras (aisladas previamente por el Grupo de Trabajo) en presencia de los principales inhibidores liberados del material lignocelulósico, así como el aislamiento de microorganismos capaces de crecer sobre estos compuestos como únicos sustratos carbonados.

Título del proyecto: Producción de compuestos con valor agregado empleando efluentes y subproductos agroindustriales como materia prima renovable

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2019

Organismo financiador: ANPCyT

Director: Comelli, Raúl Nicolás



100



UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL LITORAL

OBJETIVOS

- Desarrollar y optimizar un proceso de base tecnológica para la producción de bioetanol empleando desechos lignocelulósicos como materias primas renovables.
- Aislar y caracterizar microorganismos capaces de crecer y/o metabolizar compuestos presentes en hidrolizados lignocelulósicos.
- Realizar un *screening* de las capacidades metabólicas de levaduras en presencia de inhibidores liberados durante el proceso de producción de etanol.

METODOLOGÍA

Aislamiento de microorganismos: se procedió a la proliferación y aislamiento (método de las cinco estrías) de los microorganismos presentes en soluciones de inhibidores. Para ello, se prepararon una serie de botellas compuestas por medio salino, biomasa formada por elementos tales como yerba, corteza de árbol y hojas y distintos inhibidores (uno por cada botella): hidroximetilfurfural, ácido fórmico y ácido levulínico. Se dejaron las mismas en agitación y una vez turbias, se inoculó su contenido en placas de Petri con agar como medio base suplementado con el inhibidor correspondiente. En función de las colonias de microorganismos formadas en cada placa se hicieron una serie de reactivaciones en tubos Hach con caldo nutritivo y glucosa, controles positivos en caldo nutritivo y negativos en caldo nutritivo y el inhibidor. Una vez observado crecimiento en estos, se inoculó su contenido en placas de Petri suplementadas con el inhibidor y se volvió a inocular el contenido de las botellas, previo lavado y centrifugación, en placas de Petri pero en esta oportunidad con diferentes concentraciones de inhibidores. Una vez finalizados estos ensayos se procedió a la conservación de los microorganismos.

Screening de levaduras: Se trabajó en la puesta a punto de una metodología para el estudio del impacto de los inhibidores sobre el crecimiento y fermentación de las levaduras. Se evaluaron diferentes diluciones de inóculo, tiempos de seguimiento, temperatura de incubación y concentraciones de ácidos. Para ello, se comenzó con una cepa *S. cerevisiae* largamente estudiada en el grupo y el ensayo se realizó en microplacas de 24 pocillos. En cada uno de ellos se colocó medio YPG con agar suplementado con distintas concentraciones de inhibidores: Furfural, Ácido levulínico, Ácido fórmico, Ácido tánico, Ácido gálico, Ácido salicílico, Ácido benzoico y Ácido sórbico. Previa preparación de las placas, el inóculo de la cepa de levadura se obtuvo cultivándola en medio YPG, con agitación constante durante 12-18 horas a 30°C (cultivo overnight). La biomasa obtenida se separó por centrifugación, realizando lavados con agua destilada estéril y resuspendiéndola en un volumen adecuado. Se estimó su concentración por espectrofotometría a 600nm y se llevaron a cabo los cálculos necesarios para determinar el volumen de inóculo a sembrar de forma tal que su densidad óptica fuera de 0,05 y 0,005. Se inoculó el volumen de ácido y luego del medio YPG agar de manera tal de que el volumen final en cada pocillo fuera de 1 ml. Se sembraron 4 µL de cultivo en cada pocillo, se incubaron las microplacas a 30° C y se realizaron seguimientos de 12 hs hasta las 36 horas posteriores al inicio del ensayo.

CONCLUSIONES

A partir de los ensayos realizados se pudieron aislar microorganismos tales como *Aspergillus* spp y *Aspergillus niger* capaces de degradar ácido levulínico y ácido tánico respectivamente y bacilos esporulados Gram (+) y un *Verticillium* spp. capaces de degradar furfural. En este sentido, resulta de interés contar con microorganismos con un paquete enzimático apto para la degradación de estos compuestos, los que podrían ser empleados como agentes de biodetoxicación en una estrategia de bioprocesos consolidados (CBP).

Además, se pudo corroborar que los ácidos fórmico, tánico, gálico, benzoico, sórbico y furfural constituyeron los inhibidores más fuertes para el metabolismo de las levaduras, identificando las concentraciones óptimas para ser empleadas en ensayos de *screening* y comparación del desempeño de las diferentes levaduras estudiadas.

Ambos resultados constituyen un aporte al conocimiento y desarrollo de procesos robustos para la obtención de bioetanol de segunda generación.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Jönsson, L. (2013). Bioconversion of Lignocellulose: Inhibitors and Detoxification. *Biotechnology for Biofuels* 6:16 1–10.

Jönsson, L. y Martín, M. (2016). Pretreatment of Lignocellulose: Formation of Inhibitory By-products and Strategies for Minimizing Their Effects. *Bioresource Technology* 199; 103,112.

Liu, Z. (2004). Adaptive Response of Yeasts to Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural and New Chemical Evidence for HMF Conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31: 345–352.

Maki, M. (2011). Characterization of Some Efficient Cellulase Producing Bacteria Isolated from Paper Mill Sludges and Organic Fertilizers. *Int J Biochem Mol Biol* (ISSN : 2152-4114) 2(2): 146,154.

Nichols, N. (2014). Biological Abatement of Inhibitors in Rice Hull Hydrolyzate and Fermentation to Ethanol Using Conventional and Engineered Microbes. *Biomass and bioenergy* 79-88.

Padilha, I. (2015). Production and Characterization of Thermophilic Carboxymethyl Cellulase Synthesized by *Bacillus* sp. Growing on Sugarcane Bagasse in Submerged Fermentation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* (ISSN 0104-6632), 35-42

Parawira, W. y Tekere, M. (2011). Biotechnological Strategies to Overcome Inhibitors in Lignocellulose Hydrolysates for Ethanol Production: Review. *Critical reviews in biotechnology* (ISSN: 1549-7801) 31(1): 20,31.

Shankar, T. y Isaiarasu, L. (2011). Cellulase Production by *Bacillus pumilus* EWBCM1. *Middle-East Journal of Scientific Research* (ISSN: 1990-9233) (1): 40-45

Zhao, X. (2012). Bioethanol From Lignocellulosic Biomass. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* (ISSN: 1871-6784) 128: 25-51.