



Encuentro
de JÓVENES
INVESTIGADORES

DESEMPEÑO FERMENTATIVO DE *SPATHASPORA PASSALIDARUM* Guzmán, Victoria María

Grupo de Procesos Biológicos en Ingeniería Ambiental - Depto de Medio Ambiente (FICH-UNL)
Director: Comelli, Raúl N.

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Bioetanol, Biomasa lignocelulósica, Levaduras.

INTRODUCCIÓN

En la República Argentina, la sanción de la Ley 26.093 (“Régimen de Regulación y Promoción para la Producción y Uso Sustentable de Biocombustibles”) fue el paso fundacional en el empleo de combustibles de origen biológico o “biocombustibles”. Estos combustibles pueden 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 cual puede emplearse en motores de combustión interna tipo Otto, generalmente en mezclas con naftas, aunque determinados motores pueden emplearlo como único combustible (Wheals y col., 1999). En nuestro país, el corte de las naftas (12% establecido por Ley 27640) es posible gracias a la capacidad de producción de etanol a partir de caña de azúcar y, principalmente, de maíz.

Por el contexto energético, surge la necesidad de detectar fuentes alternativas y de bajo costo para la producción sustentable de bioetanol. Los residuos agroindustriales de base celulósica representan una fuente abundante y renovable, no compiten con los alimentos ni con la utilización de tierras para uso agrícola y son considerados la fuente más importante a nivel mundial para abastecer la demanda de bioetanol (Jönsson y col., 2013; Zhao y col., 2012; Edwards y col., 2012).

Los azúcares más abundantes en la biomasa lignocelulósica son la D-glucosa, presente tanto en la celulosa como en la hemicelulosa, y la D-xilosa, presente sólo en la hemicelulosa.

En el proceso de fermentación se pueden utilizar diferentes microorganismos, dependiendo del sustrato empleado. Las levaduras del género *Saccharomyces* se han utilizado tradicionalmente en la industria de fermentación del etanol, ya sea para el proceso de primera o segunda generación, cuando las hexosas son la fuente de carbono. Sin embargo, estas levaduras no son capaces de metabolizar pentosas a menos que sean modificadas genéticamente para expresar las rutas de asimilación de este azúcar (Kim y col., 2013; Fujii y col., 2011). En este contexto, *Spathaspora passalidarum*, una levadura capaz de fermentar

Título del proyecto: “Evaluación de inóculos alternativos para la producción de etanol de segunda generación mediante bioprocesamiento consolidado”.

Instrumento: PICT – Temas estratégicos

Año convocatoria: 2019

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica – ANPCyT

Director/a: Comelli, Raúl Nicolás

azúcares pentosa, es una plataforma potencial para aplicaciones industriales destinadas a producir etanol de segunda generación a partir de biomasa lignocelulósica.

Spathaspora passalidarum se aisló de los intestinos de los escarabajos que taladran la madera en 2006 y puede consumir y fermentar xilosa de forma natural (Nguyen y col., 2006). El enfoque en este trabajo de investigación es evaluar la capacidad fermentativa de dicha levadura en diferentes medios y condiciones.

OBJETIVOS

- Evaluar el desempeño fermentativo de *Spathaspora passalidarum* en sustratos con xilosa (desempeño ante diferentes condiciones de temperaturas, pH, concentraciones iniciales de biomasa).
- Evaluar el desempeño fermentativo de *Spathaspora passalidarum* en sustratos mixtos con glucosa/xilosa. Analizar si el transporte de la xilosa se encuentra competitivamente inhibido por glucosa.

METODOLOGÍA

Desempeño fermentativo de *Spathaspora passalidarum* en medios con diferentes condiciones iniciales de xilosa, biomasa y temperaturas.

Los ensayos de fermentación con seguimiento en el tiempo se realizaron en fermentadores con xilosa (10, 25 y 50 g/L) como única fuente de carbono suplementados con extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

Las fermentaciones se realizaron en modo *batch*, con agitación constante y temperaturas controladas de 30 y 37 °C.

Se inocularon concentraciones iniciales de biomasa de 0,25 y 0,5 g/L.

Las muestras se tomaron a tiempo inicial de 0 horas hasta un tiempo final de 28, 40 y 60 horas dependiendo de las concentraciones iniciales de sustrato.

Desempeño fermentativo de *Spathaspora passalidarum* en medios con diferentes valores de pH iniciales.

Los ensayos de fermentación con seguimiento en el tiempo se realizaron en fermentadores con xilosa (25 g/L) suplementados con extracto de levadura como fuente de nitrógeno. Posteriormente, cada fermentador fue regulado hasta la obtención de diferentes valores de pH iniciales (3, 4, 5 y 6).

Las mediciones de pH iniciales y finales se realizaron con un peachimetro digital.

Las fermentaciones se realizaron en modo *batch*, con agitación constante, temperatura controlada de 30 °C y una concentración inicial de biomasa de 0,5 g/L.

Las muestras se tomaron a tiempo inicial de 0 horas hasta un tiempo final de 40 horas.

Desempeño fermentativo de *Spathaspora passalidarum* en medios con glucosa y xilosa.

Los ensayos de fermentación con seguimiento en el tiempo se realizaron en fermentadores con glucosa (25 g/L) o xilosa (25 g/L), como únicas fuentes de carbono, y sustratos mixtos con glucosa y xilosa (20:5; 12,5:12,5; 5:20 respectivamente) suplementados con extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

Las fermentaciones se realizaron en modo *batch*, con agitación constante, temperatura controlada de 30 °C y una concentración inicial de biomasa de 0,5 g/L.

Las muestras se tomaron a tiempo inicial de 0 horas hasta un tiempo final de 40 horas.

Determinaciones analíticas y parámetros

El seguimiento de biomasa se realizó por turbidimetría, siguiendo la evolución de la misma mediante lecturas a 600 nm en espectrofotómetro (HACH DR/2010), contra blanco de agua destilada. La correlación entre la señal provista por el espectrofotómetro y la concentración de *Spathaspora passalidarum* en la muestra se determinó mediante la construcción de una curva patrón. Para ello, muestras preparadas con diferentes concentraciones de la levadura (expresadas en g/L) se midieron en espectrofotómetro y luego se aproximó la concentración de biomasa por la determinación de Sólidos Suspendidos Volátiles (Greenberg y col., 1992). Los valores de concentración de sustratos en los sobrenadantes de cultivos se midieron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) construyendo previamente una curva de calibrado que relaciona la señal (área), provista por el equipo, con diferentes concentraciones de cada sustrato (g/L). Esto se realizó en un equipo UltiMate 3000 HPLC (Termo Fisher Scientific), equipado con una columna Shodex SH-1011 y un detector de índice de refracción (RID). Además, esta técnica fue utilizada para la identificación de subproductos de fermentación como xilitol y glicerol.

La determinación de etanol, producido por la fermentación alcohólica de azúcares, se realizó utilizando el cromatógrafo gaseoso GC-2014 Shimadzu (GC).

Para la evaluación y comparación del desempeño fermentativo de *Spathaspora passalidarum* en los diferentes ensayos realizados se consideraron los siguientes parámetros estequiométricos: crecimiento de biomasa (ΔX : delta de biomasa: biomasa final - biomasa inicial); consumo neto de sustrato (ΔS : delta de consumo de azúcar: azúcar inicial - azúcar final) y rendimiento de etanol ($Y_{p/s}$: etanol máximo/ ΔS).

CONCLUSIONES

Tabla 1: Parámetros obtenidos frente a D-xilosa.

FERMENTADOR	T°	TIEMPO FERMENTACIÓN (h)	BIOMASA INICIAL (g/L)	BIOMASA FINAL (g/L)	ΔX (g/L)	XILOSA INICIAL (g/L)	XILOSA FINAL (g/L)	ΔS (%)	ETANOL g/L	Y P/S (g/g)
R1	30	28	0,503	2,845	2,34	9,733	0,303	96,9	3,37	0,357
R2		28	0,267	2,103	1,84	9,651	0,241	97,5	3,33	0,353
R3		40	0,495	3,981	3,48	24,539	0,076	99,7	9,89	0,404
R4		40	0,270	3,182	2,91	25,567	0,076	99,7	9,24	0,362
R5		60	0,486	4,814	4,33	56,479	19,605	65,3	10,84	0,294
R6		60	0,258	3,869	3,61	55,246	19,194	65,2	9,85	0,273
R'1	37	28	0,638	3,036	2,40	9,733	0,241	97,5	2,73	0,287
R'2		28	0,348	2,019	1,67	9,610	0,611	93,6	2,54	0,282
R'3		40	0,666	3,79	3,12	24,642	0,097	99,6	9,39	0,382
R'4		40	0,346	3,014	2,67	24,436	0,118	99,5	8,35	0,343
R'5		60	0,604	4,33	3,73	50,723	16,418	67,6	9,47	0,276
R'6		60	0,320	3,25	2,93	51,134	16,315	68,1	9,25	0,265

A partir de la tabla 1 podemos observar que los ensayos realizados a 30°C presentan un consumo elevado de xilosa para los fermentadores R1 a R4, sin embargo, en R5 y R6 los ΔS disminuyen un 35 %. Estos consumos se ven reflejados en los rendimientos de etanol. Además, todos los ΔX son menores cuando inoculamos con la mitad de biomasa inicial (R2, R4 y R6).

Como primeras conclusiones podríamos informar que las relaciones biomasa/sustrato inicial son necesarias para óptimos rendimientos de etanol, en nuestro caso, la obtuvimos en el fermentador R3 con un consumo total del azúcar y un $Y_{p/s}$ de 0,404.

Las relaciones biomasa/sustrato en los fermentadores R5 y R6, con mayores concentraciones de xilosa, podrían no ser suficientes provocando un efecto de inhibición por producto que afectaría el proceso de fermentación.

Los mismos ensayos se llevaron a cabo a 37 °C mostrando resultados similares a los obtenidos para 30 °C. En este rango de temperaturas no veríamos cambios significativos.

Respecto a los ensayos realizados a diferentes valores de pH podemos concluir que, dentro del rango de pH 4 a 6, el desempeño fermentativo se mantiene igual (no observamos grandes variaciones en los parámetros calculados) mientras que un pH de 3 altera negativamente dicho desempeño provocando una disminución en el consumo de azúcares y rendimientos esperados.

Respecto a los fermentadores con sustratos mixtos glucosa – xilosa se observó que presentan el mismo comportamiento diáuxico (utilización secuencial de glucosa y xilosa separadas por una fase “lag”) confirmando la preferencia de *Spathaspora passalidarum* por la hexosa sobre la pentosa.

Se podría concluir en primera medida que hay represión en el transporte de la xilosa por la glucosa en todas condiciones ensayadas.

El análisis de los cromatogramas confirma la presencia de etanol, como principal producto de fermentación, y la ausencia de glicerol – xilitol.

Por último, los consumos presentan diferencias en sus vías metabólicas y productos finales. Por un lado, la glucosa favorecería el crecimiento de biomasa celular ya que los fermentadores con mayores concentraciones de este sustrato presentan los valores ΔX más elevados y los Y_p/s más bajos. Cuando la fuente de carbono mayoritaria era la xilosa el comportamiento fue contrario, menores valores de ΔX y mayores de Y_p/s evidenciando que este último sustrato presenta un metabolismo más fermentativo (favorecido por la producción de etanol como metabolito principal).

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Edwards, MC., Doran-Peterson, J. 2012. Pectin-rich biomass as feedstock for fuel ethanol production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 95(3), 565-575.

Fujii, T., Yu, G., Matsushika, A., Kurita, A., Yano, S., Murakami, K., Sawayama, S. 2011. Ethanol production from xylo-oligosaccharides by xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* expressing β -xylosidase. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75(6), 1140-1146.

Greenberg, A., Clesceri, L., Eaton, A. 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18th Edition. Amer Public Health Assn. Washington, DC.

Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, NO. 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol Biofuels*, 6(1), 16-28.

Kim, SR., Lee, KS., Kong, II., Lesmana, A., Lee, WH., Seo, JH., Kweon, DH., Jin, YS. 2013. Construction of an efficient xylose-fermenting diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain through mating of two engineered haploid strains capable of xylose assimilation. *J Biotechnol*, 164(1), 105-111.

Nguyen, NH., Suh, SO., Marshall, CJ., Blackwell, M. 2006. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. *Mycol Res*, 110(10), 1232-1241.

Wheals, AE., Basso, LC., Alves, DM., Amorim HV. 1999. Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol*, 17(12), 482-487.

Zhao, XQ., Zi, LH., Bai, FW., Lin, HL., Hao, XM., Yue, GJ., Ho, NWY. 2012. Bioethanol from Lignocellulosic Biomass. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 128, 25-51.