

## EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO FERMENTATIVO DE *S. CEREVISIAE* EN PRESENCIA DE INHIBIDORES LIBERADOS DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

**Bodini Melina**

*Grupo de Procesos Biológicos en Ingeniería Ambiental. Departamento de Medio Ambiente  
Facultad de Ingeniería y Cs. Hídricas UNL  
Director: Dr. Comelli Raúl N.  
Codirector: Dr. Seluy Lisandro G.*

**Área: Ingeniería**

### INTRODUCCIÓN

Los combustibles de origen biológico o “biocombustibles” representan una de las alternativas más prometedoras frente a la utilización de combustibles fósiles tradicionales (petróleo y carbón) ya que constituyen una fuente de energía renovable, poseen bajo impacto ambiental y son económicamente competitivos.

En la actualidad, el bioetanol que se comercializa es denominado de primera generación, el cual se produce a partir de la fermentación de los azúcares de la caña de azúcar y maíz principalmente. Esto genera un conflicto ya que el uso de estas materias primas origina competencia por la tierra que es utilizada para la producción de alimentos, ocasionando inconvenientes económicos como aumento de precios y también daños ecológicos. Por lo tanto, las investigaciones recientes se basan en explotar sustratos alternativos como la biomasa lignocelulósica para su producción (bioetanol de segunda generación), la cual puede provenir de residuos agrícolas, forestales, de la industria papelería y subproductos de la industria alimentaria. Estos materiales lignocelulósicos comprenden una de las mejores alternativas para reemplazar la producción del bioetanol de primera generación ya que son de bajo costo y se encuentran en gran abundancia. La biomasa lignocelulósica está constituida principalmente por los polisacáridos celulosa (40%), y hemicelulosa (30%), y un polímero fenólico heterogéneo denominado lignina (15%) según Zhao y col. (2011).

Los procesos normalmente involucran un pre-tratamiento de los residuos, el cual puede realizarse por métodos físicos, químicos o biológicos con el fin de mejorar la digestibilidad de la biomasa y hacer más eficiente la etapa posterior, seguido de una hidrólisis enzimática de los polisacáridos para liberar la glucosa a partir de la celulosa, y este líquido azucarado luego es fermentado para obtener etanol.

|   |
|---|
| Título del proyecto: Evaluación del desempeño fermentativo de <i>S. cerevisiae</i> en presencia de inhibidores liberados de material lignocelulósico<br>Instrumento: PICT<br>Año convocatoria: 2016<br>Organismo financiador: ANPCyT<br>Director: Dr. Raúl Comelli. |
|---|

En la presente actividad, el estudio se enfocó en la evaluación del efecto de algunos inhibidores (Ac. Acético, Ac. Fórmico, Ac. Sórbito, Ac. Salicílico y Furfural) presentes en los materiales lignocelulósicos sobre la fermentación de la cepa *S. cerevisiae* var. Ethanol Red. Esta levadura es la más utilizada en la industria alcoholera debido a que presenta alta tolerancia al etanol e inhibidores, robustez y seguridad.

## OBJETIVOS

- Desarrollar y optimizar un proceso de base tecnológica para la producción sustentable de un biocombustible de alta demanda (bioetanol) empleando desechos agrícolas de base celulósica como materias primas renovables.
- Evaluar el desempeño fermentativo de una cepa industrial de *S. cerevisiae* en presencia de varios inhibidores típicos que son liberados durante el acondicionamiento del material lignocelulósico.

## METODOLOGÍA

### **“Screening” del efecto de diferentes inhibidores sobre el desempeño fermentativo de la levadura**

Se realizó utilizando la cepa *S. cerevisiae* var. Ethanol Red, para lo cual se ensayaron fermentaciones con diferentes inhibidores a distintas concentraciones (0,25; 0,5; 1; 1,5; 2,5; y 5 ml/l) según corresponda en un volumen de reacción igual a 50 mL, la fuente de carbono empleada fue glucosa 50 g/l, y la fuente de nutrientes fue extracto de levaduras 10 g/l. Se evaluaron a dos pHs (3.0 y 5.0) a una temperatura de 30° C.

Se utilizaron un total de 12 reactores (incluidos los controles para cada pH sin inhibidor). Se realizaron ensayos de seguimiento a las 0 – 2 – 4 – 6 – 8 – 10 – 12 y 24 hs para luego realizar determinaciones de biomasa, glucosa y etanol.

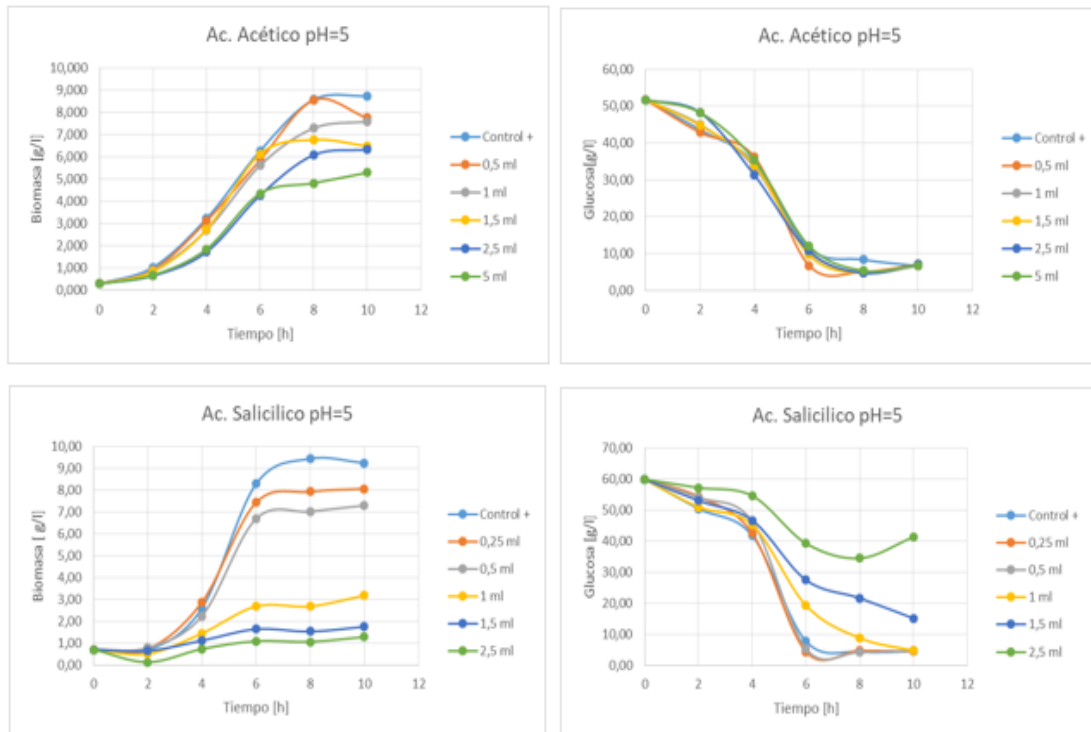
Para realizar las determinaciones correspondientes, se tomaron 1 ml directamente del medio de fermentación, se cosecharon las células por centrifugación y se re suspendieron en un volumen idéntico al inicial con agua destilada, luego se estimó la concentración de biomasa por medida espectrofotométrica a 600 nm, usando una curva de calibrado de Sólidos Suspendidos Volátiles. A los sobrenadantes obtenidos de la centrifugación se les determinó: azúcares reductores por método colorimétrico empleando el reactivo DNS. La concentración de etanol producido se aproximó mediante el empleo de un dispositivo estático desarrollado por el Grupo de Trabajo en base a un sensor de SnO<sub>2</sub> y empleando una curva de calibrado elaborada con varias concentraciones conocidas de etanol absoluto.

Previamente a la preparación de los reactores, el inóculo de la cepa se obtuvo cultivándolas en el medio YPG, con agitación constante durante 12-18 horas a 30°C (cultivo overnight), es decir en condiciones habituales para su desarrollo. La biomasa obtenida se separó por centrifugación, realizando lavados con agua destilada y re suspendiéndola en un volumen adecuado. Se estimó su concentración por espectrofotometría y se llevaron a cabo los cálculos necesarios para determinar el volumen de inóculo a sembrar en cada uno de los reactores.

Los datos obtenidos a partir de las fermentaciones se procesaron en planillas de cálculo.

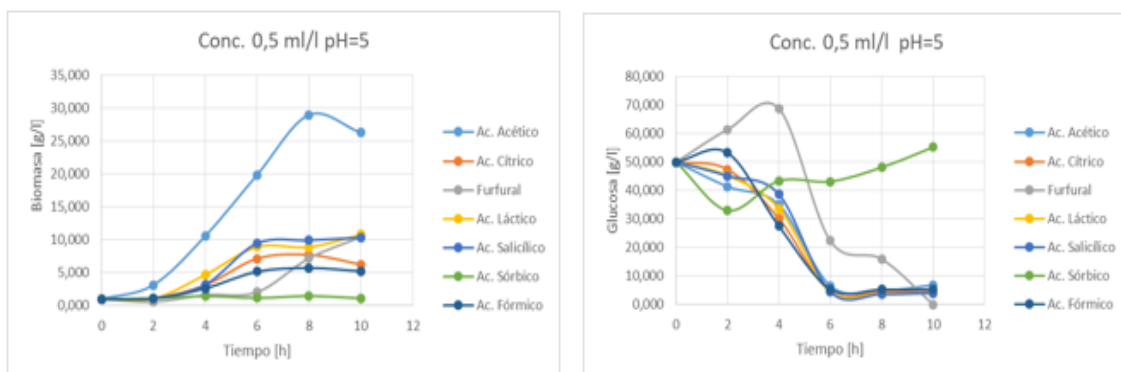
## RESULTADOS

Se presentan las gráficas del desempeño de las levaduras en presencia de los inhibidores “Ac. Acético” y “Ac. Salicílico” a modo representativo, donde se puede observar el efecto inhibitorio individual sobre cada ácido a distintas concentraciones.



**Figura 1.** Izquierda. Efecto inhibitorio a distintas concentraciones en biomasa. Derecha. Efecto inhibitorio a distintas concentraciones en glucosa.

Para una concentración fija se muestra el efecto reflejado en todos los inhibidores empleados en los ensayos. Como en el caso anterior se ha elegido a modo representativo una sola concentración y a un solo pH.



**Figura 2.** Izquierda. Efecto inhibitorio en biomasa a una concentración fija. Derecha. Efecto inhibitorio en glucosa a una concentración fija.

A modo de cierre se presenta un cuadro comparativo donde se puede observar de mayor a menor el potencial inhibitorio para todas las concentraciones que se tuvieron en cuenta en los ensayos así como también para ambos pHs.

| Conc. [ml/l] |  |
|--------------|--|
| 0,25         | pH=3 Ac. Salicílico > Ac. Fórmico > Furfural               |
|              | pH=5 Ac. Fórmico > Ac. Salicílico > Furfural               |
| 0,5          | pH=3 Ac. Salicílico > Ac. Fórmico > Furfural > Ac. Acético |
|              | pH=5 Furfural > Ac. Fórmico > Ac. Salicílico > Ac. Acético |
| 1            | pH=3 Ac. Fórmico > Ac. Salicílico > Furfural > Ac. Acético |
|              | pH=5 Furfural > Ac. Salicílico > Ac. Fórmico > Ac. Acético |
| 1,5          | pH=3 Ac. Fórmico > Ac. Salicílico > Furfural > Ac. Acético |
|              | pH=5 Furfural > Ac. Salicílico > Ac. Fórmico > Ac. Acético |
| 2,5          | pH=3 Furfural > Ac. Fórmico > Ac. Salicílico > Ac. Acético |
|              | pH=5 Furfural > Ac. Salicílico > Ac. Fórmico > Ac. Acético |

**Tabla 1.** Resumen del potencial inhibitorio para todas las concentraciones y pH.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten seleccionar condiciones “desafío” para cada inhibidor (una concentración y pH) y sientan las bases para futuros ensayos de evaluación de estrategias para superar o minimizar el efecto inhibitorio de los compuestos liberados durante el acondicionamiento del material lignocelulósico.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**Zhao X., Zi L., Bai F., Lin H., Hao X., Yue G., Ho N.,** 2012. Bioethanol from lignocellulosic biomass. *Advance in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 128, 25-51.

**Balat M.,** 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52, 858–875.

**Jönsson L., Alriksson B., Nilvebrant N.,** 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, 6, 1-16.