

CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS CON POTENCIAL APLICACIÓN EN PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

Cunha Bolzico Bruna

*Grupo de Procesos Biológicos en Ingeniería Ambiental. Departamento de Medio Ambiente. Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas, UNL
Director: Comelli Raúl Nicolás
Codirectora: Benzzo María Teresita*

Área: Ciencias Biológicas

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. Según Balat (2011), el bioetanol es el biocombustible más ampliamente utilizado para transporte en el mundo, el cual puede emplearse en motores de combustión interna tipo Otto. En Argentina es mezclado con nafta en un 10% y se pretende llegar a un corte de la misma del 20% para el año 2020. 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 puede generar un conflicto ético 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 ecológicos. 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 papelera y subproductos de la industria alimentaria (Jönsson y col., 2013).

En la región de Santa Fe y Entre Ríos, estos residuos comprenden principalmente los rastrojos de maíz y sorgo, cáscaras de la producción de jugos cítricos y bagazo generado en la industria cervecera. Estos materiales lignocelulósicos comprenden una de las mejores alternativas para reemplazar la producción del bioetanol de primera generación ya que son de bajo costo, se encuentran en gran abundancia ocasionando problemas de almacenamiento y disposición, por lo que podrían ser aprovechados y tienen la principal ventaja de que no son usados para alimento.

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 (Zhao y col., 2011), y este líquido azucarado luego es fermentado para obtener etanol.

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

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: ANPCyT

Director: Raúl Nicolás Comelli

Existen todavía varios desafíos para la conversión de la biomasa lignocelulósica en etanol, debido particularmente a que las pentosas contenidas en la hemicelulosa que son liberadas durante el pre-tratamiento, no pueden ser fermentadas a etanol y CO₂ tan eficientemente, a una tasa y rendimientos aceptables desde el punto de vista industrial, como la glucosa por especies etanológicas principalmente *Saccharomyces cerevisiae*.

Según Wang y col. (2015), para que la producción de bioetanol sea rentable, la co-fermentación de glucosa y pentosas es esencial. Para ello la estrategia que podría ser implementada es el uso de microorganismos modificados genéticamente que puedan utilizar las pentosas, principalmente xilosa, mediante enzimas y vías metabólicas adecuadas. Sin embargo, el consumo de ambos azúcares en simultáneo está impedido ya que todos los transportadores de xilosa en *S. cerevisiae* están competitivamente inhibidos por glucosa, como muestran los autores (Farwick y col., 2014).

En la presente actividad, el estudio se enfocó en la etapa de fermentación y selección de cepas de levaduras con las mejores características que podrían ser empleadas como plataforma productiva.

OBJETIVOS

- Desarrollar y optimizar un proceso de base tecnológica para la producción de bioetanol de segunda generación empleando desechos agroindustriales
- Estudiar el metabolismo de numerosas cepas de levaduras disponibles en el Grupo de Procesos Biológicos en Ingeniería Ambiental
- Evaluar y comparar el desempeño fermentativo de las cepas anteriores
- Seleccionar levaduras con capacidad de metabolizar xilosa

METODOLOGÍA

Screening de capacidades metabólicas de levaduras

Se realizó utilizando 28 cepas de levaduras, para lo cual se ensayaron fermentaciones con diferentes fuentes de carbono y variación de parámetros operacionales (microaireación) y en base a ello, la determinación de la producción de bioetanol en las distintas condiciones.

El inóculo de cada una de ellas se obtuvo cultivándolas en el medio YPG, con agitación constante durante 12-18 horas a 30°C (cultivo overnight). La biomasa obtenida se separó por centrifugación, y se estimó su concentración por espectrofotometría. Se determinó el volumen de inóculo a sembrar en cada uno de los reactores, de forma tal que su concentración final en los mismos fue de 0,5 g/L. Se utilizaron un total de 10 tubos, incubados en estufa a 37°C. Los reactores con 10 ml de medio permitieron evaluar el desempeño de las cepas en anaerobiosis, mientras que los reactores con 2,5 ml en microaerobiosis. Los primeros incluyeron: un tubo control (sin fuente de carbono), tubos con glucosa (50 g/L) y otros con xilosa (50g/L), como las distintas fuentes de carbono. Los de microaerobiosis se ensayaron con xilosa (50g/L), incluyendo un tubo control. El pH del medio de fermentación se mantuvo alrededor de 5, como nutrientes se adicionó extracto de levadura a todos los reactores. Se realizaron ensayos de 24 hs, sin seguimiento, con toma de muestra a tiempo inicial y a tiempo final (48 hs para los tubos con xilosa). Para realizar las determinaciones correspondientes, se tomaron 1 ml directamente del medio de fermentación, se cosecharon las células por centrifugación y se resuspendieron en un volumen idéntico al inicial con agua destilada, luego se estimó la concentración de biomasa por medida espectrofotométrica a 600nm, usando una curva de calibrado de Sólidos Suspendidos Volátiles. A los sobrenadantes obtenidos se les determinó: azúcares reductores por método colorimétrico empleando el reactivo DNS (Miller G., 1959) y concentración de etanol producido mediante un equipo estático desarrollado por el Grupo de trabajo en base a un sensor de SnO₂. En ambas técnicas se utilizaron curvas de calibrado

elaboradas a partir de patrones de concentraciones conocidas de los azúcares, para determinar el consumo de glucosa y xilosa, y de etanol absoluto con el fin de estimar su producción. Los datos obtenidos a partir de las fermentaciones se procesaron en planillas de cálculos.

RESULTADOS

Se establecieron las cepas que crecieron en presencia de xilosa. En ellas, se observó un aumento de la de biomasa respecto a los tubos controles, pero en la mayoría la concentración de esta resultó menor que en los reactores alimentados con glucosa. Solamente en estos últimos se detectó etanol. Ninguna cepa que creció con xilosa mostró producción de etanol. Cuando se evaluó el consumo de azúcares, mediante la técnica por DNS, se observó que la concentración de glucosa al finalizar el tiempo de fermentación disminuyó considerablemente respecto a la inicial, en cambio para las cepas que aumentaron su biomasa en presencia de la pentosa no se registró consumo evidente del azúcar. Esto podría deberse a que estas levaduras transforman la xilosa en otros azúcares que también son reductores (como por ejemplo los de la vía de las pentosas) y por lo tanto son detectados por el reactivo y la técnica. En la tabla 1 se resumen los resultados. De las 28 cepas analizadas, se identificaron 15 que crecieron con xilosa como única fuente de carbono en anaerobiosis y microaerobiosis. Las cepas 16, 18, 19 y 21 mostraron un crecimiento superior con xilosa que con la fuente habitual, glucosa. Las cepas 13,15,16, 17 y 18 no mostraron consumo evidente de la glucosa ni producción de etanol.

En esta etapa, se logró la identificación de las cepas de levaduras con la maquinaria metabólica necesaria para la incorporación de xilosa (presencia de transportadores) y su metabolización.

Tabla1: Resumen de los resultados obtenidos para las 28 cepas de levaduras.

Número de cepa	Producción de etanol a partir de glucosa (ml/l)	Consumo de glucosa (%)	Crecimiento con xilosa en anaerobiosis/ micro aerobiosis	Producción de etanol a partir de xilosa
1	> 20	100	Sí/Sí	No
2	> 20	68	No/No	-
3	Entre 15 y 20	87	Sí/Sí	No
4	> 20	42,2	Sí/Sí	No
5	Entre 15 y 20	87,5	No/No	-
6	Entre 15 y 20	85,2	No/No	-
7	< 15	76,7	No/No	-
8	> 20	72,6	Sí/Sí	No
9	> 20	84	No/No	-
10	Entre 15 y 20	67	No/No	-
11	< 15	32,9	No/No	-
12	< 15	58,5	No/No	-
13	No produce	2,8	No/No	-
14	< 15	6,2	Sí/Sí	No
15	No produce	0	Sí/Sí	No
16	No produce	0	Sí/Sí	No
17	No produce	0	No/No	-
18	No produce	3,5	Sí/Sí	No

19	> 20	51,2	Sí/Sí	No
20	< 15	34,9	Sí/Sí	No
21	< 15	25,1	Sí/Sí	No
22	Entre 15 y 20	69,4	No/No	-
23	Entre 15 y 20	65,1	No/No	-
24	< 15	45,1	No/No	-
25	< 15	12	Sí/Sí	No
26	Entre 15 y 20	83	Sí/Sí	No
27	Entre 15 y 20	84,5	Sí/Sí	No
28	< 15	36	Sí/Sí	No

A modo de conclusión, se logró identificar cepas de levaduras con la capacidad de metabolizar xilosa. Ensayos futuros estarán centrados en el estudio de la maquinaria de transporte de las mismas y utilización de la xilosa, con énfasis en la posible represión mediada por la glucosa. Las mejores candidatas serán identificadas hasta especie mediante herramientas moleculares y luego empleadas como plataformas accesorias para la producción de etanol de segunda generación.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Balat M.**, 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52, 858–875.
- Farwick A., Bruder S., Schadeweg V., Oreb M., Boles E.**, 2014. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xilose without inhibition by D-glucose. *PNAS*, 111, 5159-5164.
- Jönsson L., Alriksson B., Nilvebrant N.**, 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, 6, 1-16.
- Miller G.**, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Wang C., Bao X., Li Y., Jiao C., Hou J., Zhang Q., Zhang W., Liu W., Shen Y.**, 2015. Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization. *Metabolic Engineering*, 30, 79-88.
- 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.