

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

Macagno M. Victoria

*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

Palabras clave: bioetanol, levadura, cinética, altas temperaturas.

INTRODUCCIÓN

Los combustibles fósiles representan un recurso no renovable cuya demanda actual los posiciona en una situación crítica, generando la necesidad de producir combustibles alternativos como lo es el bioetanol. Este combustible de origen biológico o “biocombustible” representa una alternativa renovable, sustentable y económicamente competitiva, producida a partir de la degradación de biomasa lignocelulósica.

Según Bocchetto R. y col., (2019) Argentina ha alcanzado un rol destacado en estos años como proveedor nacional e internacional de biocombustibles. Sin embargo, para continuar en este camino se requiere incrementar los esfuerzos en investigación y desarrollo. En el Norte argentino, el bioetanol proveniente la caña de azúcar, “etanol de primera generación”, es producido con una capacidad de aproximadamente 550.000 m³/año, representando la mitad de la producción argentina de ese biocombustible.

Sin embargo, la producción de biocombustibles a partir de biomásas que forman parte de la cadena alimenticia genera incertidumbre debido a la posible competencia con los alimentos. En este sentido el uso de biomásas lignocelulósicas para la obtención de bioenergía mediante tecnología de segunda generación resulta esencial (Grasso, D. 2019). Además, el aprovechamiento de los residuos de la producción agrícola, pecuaria y de plantas procesadoras para obtención de productos con valor agregado como el bioetanol abre una importante contribución para el desarrollo de la economía circular.

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.

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*.

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

La temperatura de fermentación resulta un parámetro crítico a nivel industrial, siendo 28-30°C la temperatura ampliamente aceptada como óptima para la producción de etanol cuando se emplean cepas de *S. cerevisiae*. Sin embargo, la temperatura óptima de hidrólisis enzimática usada en los procesos de SSF "Fermentación y Sacarificación simultánea" de obtención de bioetanol es de 45-50°C (Zhang, 2011). Por lo tanto, el estudio de fermentación de la glucosa a altas temperaturas resulta crítico.

El propósito de esta investigación es la evaluación de distintas cepas de levaduras con potenciales aplicaciones en la producción de bioetanol, analizando su metabolismo frente a distintas condiciones y fuentes de carbono, de manera tal de seleccionar aquellas que podrían ser empleadas como plataforma productiva.

OBJETIVOS

- Estudiar el metabolismo de diferentes cepas de levaduras para la producción de biocombustibles de segunda generación (2G).
- Evaluar y comparar el desempeño fermentativo de dichas cepas utilizando xilosa como fuente de carbono.
- Seleccionar levaduras con capacidad de desarrollo a altas temperaturas.

METODOLOGÍA

Screening de capacidades metabólicas de levaduras

El screening se realizó utilizando 6 cepas de levaduras para evaluar la cinética de producción de biomasa y de consumo de pentosa, con xilosa como fuente de carbono, y 5 cepas de levaduras para estudiar el desempeño a altas temperaturas, con glucosa como fuente de carbono. En base a ello, se determinó la producción de bioetanol en las distintas condiciones. Para el estudio cinético se realizaron ensayos bajo condiciones de microaerobiosis, con un caudal de aire de 50 ml/min, a 37°C, con xilosa como única fuente de carbono. Para cada cepa se utilizaron dos reactores de 100 ml de capacidad unidos a un sistema de aireación controlada, compuesto por mangueras de silicona unidas a un caudalímetro, conectado a un aireador de pecera. El caudal deseado se reguló mediante una pequeña válvula.

El inóculo inicial de cada cepa se obtuvo a partir de un cultivo en medio YPX, con agitación constante durante 48 hs a 37°C, posterior a un cultivo en medio YPG con agitación constante durante 24 hs a 30°C. La biomasa se separó mediante centrifugación, estimando su concentración por espectrofotometría para determinar el volumen de inóculo a sembrar en cada reactor, de forma tal que su concentración final en el mismo resulte de 1 g/L. Cada reactor consistía de 30 ml de medio, con una concentración de 10 g/L de xilosa, 5 g/L de extracto de levadura.

Para realizar determinaciones analíticas, se tomó 1 ml de muestra directamente del reactor, cosechando las células por centrifugación y estimando la concentración de biomasa mediante espectrofotometría a 600 nm, utilizando una curva de calibrado de Sólidos Suspendidos Volátiles. A cada sobrenadante se le determinó: azúcares reductores (xilosa) por método colorimétrico empleando el reactivo DNS (Miller G., 1959), a partir de una curva de calibrado construida con diferentes concentraciones del azúcar, y concentración de bioetanol, mediante cromatografía gaseosa (GC).

Se realizó la toma de muestra cada 2 hs, durante 12 hs. Finalizado este tiempo, se inocularon nuevamente los reactores, dejándolos crecer en estufa a 37°C durante 12 hs, representando las 12 hs iniciales.

Luego se continuó con la toma de muestra cada 2 hs, de manera tal de completar las 24 hs. En cuanto a los ensayos a alta temperatura, se realizaron a 45°C en condiciones de anaerobiosis, con glucosa como fuente de carbono. Para cada cepa se utilizaron dos

reactores de 10 ml de capacidad, uno para contar con un control a 30°C, y otro para el ensayo en sí.

El inóculo de cada cepa se obtuvo de un cultivo en medio YPG, con agitación constante durante 24-48 hs, según la cepa, a 30°C. Se procedió de igual manera que en la primera línea para la determinación del volumen de inóculo a sembrar en cada reactor, debiendo alcanzar en este caso una concentración inicial de 0.5 g/L. Cada reactor consistía de 25 g/L de glucosa y 1 g/L de extracto de levadura.

Para las determinaciones analíticas se tomaron 0.5 mL de muestra directamente del reactor para el tiempo cero y a tiempo 24 hs, y 1 mL pasadas las 48 hs. La biomasa se separó del sobrenadante por centrifugación, de manera tal de estimar su concentración siguiendo el mismo procedimiento mencionado anteriormente. Luego, la determinación de la concentración de azúcares y bioetanol se realizó a través de los métodos ya mencionados. Los datos obtenidos a partir de las fermentaciones se procesaron en planillas de cálculos.

RESULTADOS

Para los ensayos de cinética de crecimiento de biomasa y de consumo de xilosa, se obtuvieron los parámetros cinéticos representativos del desempeño fermentativo de las cepas, como lo son la velocidad específica de consumo de azúcares, r_s , y la velocidad específica de crecimiento de biomasa, r_b . Se obtuvieron también los valores correspondientes al consumo neto de sustrato (xilosa), ΔS , y el aumento en la concentración de biomasa, Δx . Finalmente, se determinó mediante cromatografía gaseosa (GC) la concentración de etanol en los sobrenadantes, para finalmente obtener el rendimiento de etanol Y_e [g etanol/g sustrato]. En la Tabla 1 se adjuntan los valores correspondientes a cada parámetro, para cada cepa.

Tabla 1 – Parámetros cinéticos obtenidos para las 6 cepas levaduras ensayadas

Cepa	r_b [g/L.h]	r_s [g/L.h]	ΔS [%]	ΔE [g/L]	Y_e [gE/gS]
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0.57	0,74	94.2	-	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0.52	0.38	88.2	0.08	-
<i>Candida sp.</i>	0.48	0.44	97.5	0.075	-
<i>Spathaspora passalidarum</i>	1.30	1.40	99	2.13	0.25
<i>Oogateae siamensis</i>	0.88	0.83	98	-	-
<i>Yamadazyma sp.</i>	0.69	0.71	95.5	0.04	-

En cuanto a las cepas *Meyerozyma guilliermondii*, *Kluyveromyces marxianus* y *Candida sp.*, se observó que la producción de etanol fue muy baja, hasta nula, por lo que no fue posible llegar a un rendimiento de etanol.

En lo que respecta al crecimiento de biomasa, *Spathaspora passalidarum* obtuvo la mayor velocidad de aumento de biomasa, seguida de la cepa *O. siamensis* y, finalmente, de *Yamadazyma sp.* En cuanto al sustrato, *S. passalidarum* consumió rápidamente el azúcar, con la mayor tasa, mientras que *Yamadazyma sp.* y *O. siamensis* demostraron un desempeño similar. Finalmente, solamente fue posible obtener un rendimiento de etanol para la levadura *Spathaspora*, siendo éste de 0.25 g etanol/g sustrato. Considerando que el rendimiento máximo de etanol está determinado en 0.5 g etanol/g sustrato, esta levadura alcanzó la mitad de dicho rendimiento.

Para el estudio del desempeño metabólico de las cepas a alta temperatura, se obtuvieron los siguientes parámetros: crecimiento de biomasa Δx [g biomasa/L], consumo de sustrato ΔS [% sustrato] y producción de etanol ΔE [g etanol/L]. Considerando la producción de etanol y el consumo de sustrato, se calculó el rendimiento de etanol Y_e [g etanol/ g glucosa]. Los valores correspondientes se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 – Parámetros de desempeño a alta temperatura para las 5 cepas ensayadas

Cepa	T [°C]	Δx [g/L]	ΔS [g/L]	ΔE [g/L]	Y_e [g etanol/g glucosa]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>Windsor</i>	30	1.69	100%	8.62	0.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>Windsor</i>	45	0.97	48%	3.20	0.3
<i>Saccharomyces Bayanus</i>	30	1.94	100%	8.32	0.4
<i>Saccharomyces Bayanus</i>	45	1.03	100%	4.90	0.2
<i>Lachancea thermotolerans</i>	30	1.49	100%	16.97	0.5
<i>Lachancea thermotolerans</i>	45	0.31	2.2%	0.33	-
<i>Ogataea siamensis</i>	30	0.67	33.75%	1.86	0.3
<i>Ogataea siamensis</i>	45	0.79	51.2%	1.80	0.2
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	30	2.30	100%	11.70	0.5
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	45	2.38	100%	12.42	0.5

Se puede observar que las primeras tres cepas disminuyen su crecimiento a 45°C, siendo la cepa *L. Thermotolerans* la que más bajo crecimiento demostró. En cuanto a la levadura *O. siamensis*, presento un leve aumento en el crecimiento a 45°C. Finalmente, la cepa *K.marxianus* arrojó una producción de biomasa levemente mayor a 45°C, demostrando ser tolerante a esta temperatura.

En lo que respecta al consumo de glucosa, se observa que las cepas *S. bayanus* y *K.marxianus* consumieron la totalidad del azúcar a la mayor temperatura, mientras que las cepas *S. cerevisiae* var. *Windsor*, *O. siamensis* y *L. thermotolerans* sólo consumieron un porcentaje. Particularmente, el consumo de glucosa de ésta última cepa fue muy bajo, de un 2.2%.

Finalmente, en lo que respecta a la producción de bioetanol, la misma disminuyó en todos los casos para una temperatura de 45°C, lo que verifica lo expresado en otros estudios. Sin embargo, cabe destacar que la cepa *K.marxianus* arrojó un rendimiento de etanol de 0.5 g etanol/g glucosa, siendo el mismo el rendimiento máximo teórico de etanol que pueden alcanzar las levaduras en medios con glucosa como sustrato. Esto permite afirmar, con más certeza, que esta cepa resulta ser tolerante a la temperatura de 45°C.

CONCLUSIONES

A modo de conclusión, se estudió el consumo de xilosa y producción de etanol a partir de la pentosa en condición de microaerobiosis, por parte de levaduras que asimilan dicho sustrato. Se determinó que la cepa *K.marxianus* tolera altas temperaturas, produciendo etanol. Ensayos futuros se enfocarán en el desempeño metabólico de las presentes cepas frente a distintas condiciones y fuentes de carbono.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Bocchetto, R.**, 2020. Bioeconomía del Norte Argentino: Situación Actual, Potencialidades y Futuros Posibles. Repositorio INTA.
- Grasso, D.** 2019. Bioetanol de Segunda Generación en el INTA. INTA.
- Miller G.**, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31, 426-428.
- Zhang B., Zhang L., Dongmei W., Xiaolian G., Hong j., 2011.** Identification of a xylose reductase gene in the xylose metabolic pathway of *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777. J Ind Microbiol Biotechnol,38,2001-2010.
- 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.