



SCREENING DE BACTERIAS COMO PLATAFORMAS ACCESORIAS EN BIOPROCESOS CONSOLIDADOS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL CELULÓSICO

Guzmán, Victoria María

Grupo de Procesos Biológicos en Ingeniería Ambiental - Depto de Medio Ambiente (FICH-UNL)

Director: Comelli, Raúl N.

Codirector: Isla, Miguel A.

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Bioetanol, Biomasa lignocelulósica, Bacterias.

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 de-terminados motores pueden emplearlo como único combustible (Wheals, 1999). En nuestro país, el corte de las naftas (10%) 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 (Jonsson y col., 2013; Zhao y col., 2012; Edwards y col., 2012).

En la naturaleza, numerosos microorganismos son capaces de utilizar celulosa nativa como fuente de carbono y energía para soportar su crecimiento y metabolismo, para lo cual disponen de la maquinaria genética apropiada para sintetizar y secretar celulasas. Estos hallazgos han inspirado el desarrollo de sistemas basados tanto en microorganismos individuales como consorcios microbianos para la producción de etanol y químicos valiosos directamente de biomasa lignocelulósica (Zhu y col., 2016; Jimenez y col., 2014).

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

Instrumento: PICT – Temas estratégicos

Año convocatoria: 2017

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

Director/a: Comelli, Raúl Nicolás



Federación
Universitaria
del Litoral

100



UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL LITORAL

En la industria de producción de etanol a partir de materias primas azucaradas (por ej., caña de azúcar y maíz), se emplea el término “sacarificación y fermentación en simultáneo” (SSF en la literatura) para denominar al proceso productivo, e implica que la liberación enzimática de los azúcares presentes en la biomasa acondicionada (principalmente dextrinas) y la fermentación transcurren en el mismo reactor y al mismo tiempo y temperatura. Cuando se aplica esta estrategia en la industria de producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos, se emplea el término “sacarificación y co-fermentación simultánea (SSCF en la literatura) para denominar al proceso productivo, e implica que la liberación enzimática de los azúcares presentes en la biomasa acondicionada (principalmente dextrinas) y la fermentación de azúcares de 5 y 6 carbonos, que se metabolizan en forma secuencial (Lee y col., 2017). A diferencia de las materias primas a base de azúcar y almidón convencionales, los hidrolizados de biomasa lignocelulósica contienen una cantidad significativa de azúcares de pentosa, como la xilosa y arabinosa, además de azúcares de glucosa, manosa y galactosa. El azúcar pentosa contenida en las hemicelulosas no se puede fermentar en etanol y CO₂ tan eficientemente como los azúcares de hexosa por las especies etanológicas convencionales como *Saccharomyces cerevisiae*. Si solo se fermentan los azúcares de hexosa de la biomasa, quedando los azúcares de pentosa, el rendimiento de la materia prima para la producción de bioetanol será menor y, mientras tanto, las pentosas no fermentadas permanecerán con el destilado y aumentarán la inversión de capital y el consumo de energía en el tratamiento del destilado (Zhao y col., 2012).

Por lo tanto, el enfoque en este trabajo de investigación es encontrar cepas bacterianas con capacidad de fermentación de pentosas siendo esta biomasa reconocida como segura (GRAS) ya que determinados residuos pueden utilizarse para alimentación animal y tolerancia a elevadas concentraciones de etanol.

OBJETIVOS

- Caracterizar metabólicamente diferentes cepas de bacterias lácticas aisladas previamente como plataformas accesorias para la producción de etanol (capacidad de fermentar diferentes pentosas y hexosas).
- Evaluar el desempeño fermentativo de diferentes cepas bacterianas seleccionadas, (desempeño ante diferentes temperaturas, tolerancia a distintas concentraciones de etanol, velocidades de crecimiento y consumo de azúcares).
- Identificar los productos de fermentación.

METODOLOGÍA

Espectro de fuentes de carbono metabolizadas por bacterias

Empleando diferentes fuentes de carbono (xilosa, arabinosa, ribosa, glucosa, manosa, galactosa, xilitol, glicerol y rhamnosa), se realizaron ensayos en medios líquidos, en modo batch, considerando variables adecuadas tales como temperatura, agitación y microaireación o anaerobiosis.

Para el screening, las cepas crecieron hasta saturación y luego se realizaron repiques utilizaron reactores que contenían 10 ml de caldo nutritivo, sales y las respectivas fuentes de carbono a una concentración de 1 g/L. La biomasa se calculó por medida espectrofotométrica a 480 nm a tiempo 0 y 48 horas.

Velocidad de crecimiento y consumo de azúcares

En una segunda etapa, cepas seleccionadas se volvieron a ensayar en reactores que contenían 50 ml de caldo nutritivo, sales y los azúcares: glucosa, xilosa, arabinosa de manera

individual y combinados, a una concentración de 10 g/L. El seguimiento de este proceso se realizó tomando muestras cada 4 horas durante dos días.

La concentración de biomasa se calculó correlacionando la medida espectrofotométrica (a 480 nm) con una curva de calibrado de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV), determinados de acuerdo con la técnica estándar (Rice y col., 2012).

Los azúcares reductores se determinaron por el método colorimétrico de Miller (1959), empleando el reactivo DNS y la glucosa se determinó utilizando un kit comercial (Wiener lab)

Relación temperatura – tolerancia a etanol

En función de los ensayos previos, se seleccionaron bacterias con determinadas características a las cuales se les hizo un seguimiento en reactores de 5 ml, con medio líquido MRS, luego de someterlas a diferentes concentraciones de etanol (5 y 10%) y temperaturas (37, 45 y 53 °C).

La biomasa se calculó por medida espectrofotométrica a 480 nm a tiempo 0, 6, 24, 36, 48 y 60 horas.

Productos de fermentación

Los productos finales de las fermentaciones, ácidos orgánicos (láctico, acético y fórmico) fueron evaluados mediante HPLC (ThermoScientific Ultimate 3000).

RESULTADOS

Se utilizaron 56 cepas bacterianas para realizar el espectro de fuentes de carbono a partir de las cuales se identificaron 9 potencialmente fermentadores de xilosa y 25 de arabinosa.

Para llevar a cabo la segunda etapa de fermentación en reactores con mayor concentración de azúcares se seleccionaron siete cepas lácticas fermentadoras de xilosa, arabinosa y glucosa y otras tres solo de arabinosa y glucosa, la mayoría también fermentadora de galactosa y manosa. De los resultados obtenidos pudo evidenciarse que no hay inhibición en el consumo de xilosa y arabinosa en presencia de glucosa, pero si se pueden observar diferencias en el rendimiento fermentativo al aumentar la concentración de pentosas en el medio. Dentro de las siete cepas seleccionadas para xilosa se encontró que solamente tres consumieron más del 60% del azúcar, mientras que las restantes entre un 20 a 50%.

Por otro lado, el consumo de hexosa en el tiempo es siempre mayor al de las pentosas.

Los productos finales de las fermentaciones fueron analizados mediante HPLC, la mayoría de estas bacterias presentan un metabolismo heterofermentativo produciendo ácido láctico, acético y fórmico. Se encontraron escasas cepas homofermentativas y hasta el momento dentro de las diez utilizadas para el seguimiento de azúcares solo una presenta éste tipo de metabolismo.

El ensayo de incubación a diferentes temperaturas y concentraciones de etanol, realizado con cinco cepas crecidas en un overnight con y sin el agregado de alcohol, presentó los mejores resultados en dos cepas que evidenciaron elevados crecimientos a 37°C tolerando 5 y 10% de etanol en ambas condiciones, entre 100 y 190% más de biomasa inoculada a tiempo cero. Las tres restantes solo presentaron grandes porcentajes de biomasa con 5% de alcohol.

Un resultado llamativo fue el buen crecimiento de las cinco cepas a 60°C para ambas concentraciones de etanol, entre 90 y 150% más de biomasa, pero en un overnight que contenía solamente medio de cultivo.

Cabe destacar el escaso crecimiento en todas las condiciones para la temperatura de 45°C.

Finalmente, queda realizar la identificación molecular de los géneros bacterianos que presenten las mejores capacidades fermentadoras de pentosas y hexosas mencionadas.

CONCLUSIONES

El screening permitió identificar candidatos interesantes para ser empleados como microorganismos accesorios a las levaduras en la realización futura de un “bioprocesamiento consolidado” buscando maximizar la conversión en bioetanol de los sustratos carbonados liberados durante el proceso de acondicionamiento de la biomasa de base celulósica y disminuyendo los costos asociados al proceso global (fermentación y disposición de los residuos)

Por lo tanto, estos primeros resultados obtenidos representan un aporte significativo para el desarrollo y optimización de un proceso robusto y sustentable.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

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

Jimenez, DJ., Korenblum, E., Van Elsas, JD. (2014). “Novel multispecies microbial consortia involved in lignocellulose and 5-hydroxymethylfurfural bioconversion”. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:2789-2803.

Jönsson, L., Alriksson, B., Nilvebrant, N. (2013). “Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification”. *Biotechnology for Biofuels*, 6:16-28.

Lee, YG., Jin, YS., Cha, YL., Seo, JH. (2017). “Bioethanol production from cellulosic hydrolysates by engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae*”. *Bioresource Technology* 228, 355–361.

Miller (1959). “Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar”. *Anal. Chem.* 31: 426-428.

Rice, EW., Baird RB., Eaton, AD., Clesceri LS. (2012). “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”, 20th ed. American Public Health Association, USA.

Wheals, A. (1999). “Fuel ethanol after 25 years”. *Trends Biotechnol.* 17: 482-7.

Zhao, XQ., Zi, LH., Bai, FW., Lin, HL., Hao, XM., Yue, GJ., Ho, NWY. (2012). “Bioethanol from Lignocellulosic Biomass”. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 128: 25-51.

Zhu, JQ., Li, X., Qin, L., Li, WC., Li, HZ., Li, BZ., Yuan, YJ. (2016). “*In situ* detoxification of dry dilute acid pretreated corn stover by co-culture of xylose-utilizing and inhibitor-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* increases ethanol production”. *Bioresource Technology* 218: 380–387.