

Utilización de microorganismos para la producción de energías renovables

Trabajo fin de grado
2012/2013

Álvaro Mourenza Flórez

Utilización de microorganismos para la producción de energías renovables

Trabajo fin de grado
Curso 2012/2013

Alvaro Mourenza Flórez



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS

TRABALLO FIN DE GRAO

D/Dna. Manuel Becerra Fernández autorizo a presentación do Traballo de Fin de Grao:

Utilización de microorganismos para la producción de energías renovables

presentado polo alumno D. **Álvaro Mourenza Flórez** para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

En A Coruña, a 14 de Xuño de 2013

Asdo.: Manuel Becerra Fernández

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS:

Me gustaría dar mis más sinceros agradecimientos al Dr. Manuel Becerra Fernández por permitirme realizar este trabajo en el laboratorio de bioquímica y biología molecular de la facultad de ciencias de la universidad de A Coruña, pero sobre todo, por ayudarme en todo momento con cualquiera de mis dudas y con la elaboración de diversas partes del trabajo, así como por su apoyo moral y su gran actitud cooperativa. Más que un tutor, ha sido un gran compañero de trabajo

Me gustaría agradecerle también, a María E. Álvarez Cao todo el esfuerzo y la infinita paciencia que ha demostrado a la hora de enseñarme las diferentes técnicas de laboratorio empleadas en el trabajo, así como su ayuda a la hora de elaborar e interpretar los datos.

A los miembros del laboratorio (profesores y estudiantes), me gustaría darles las gracias por aceptarme y ayudarme desde el inicio, hasta el final de este pequeño recorrido.

Por último, pero no menos importante, me gustaría darle las gracias a Talía Rodríguez Arribas por su constante ayuda durante la redacción del trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Introducción.....	1
Metano.....	3
Hidrógeno.....	5
Biodiesel.....	5
Butanol.....	9
Isobutanol.....	10
Etanol.....	10
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
3.1 Cepas empleadas.....	19
3.2 Medios de cultivo y preinóculos.....	19
3.3 Medidas de actividad enzimática.....	20
3.3.1 Determinación cuantitativa de la actividad α -galactosidasa intracelular y extracelular con PNPG (p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido).....	20
3.3.2 Determinación cuantitativa de la actividad β -galactosidasa.....	21
3.3.3 Determinación cuantitativa de la actividad invertasa.....	22
3.4 Determinación del consumo de azúcares.....	23
3.5 Determinación de la concentración de etanol.....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1 Crecimiento en medio sintético con lactosa.....	27
4.2 Crecimiento en un medio sintético con rafinosa.....	29
4.3 Crecimiento en medio complejo con lactosa, ultrafiltrado de lactosuero....	31

4.4 Crecimiento en un medio complejo con rafinosa, melaza de caña.....	33
4.5 Perspectivas futuras.....	35
5. CONCLUSIONES.....	39
6. BIBLIOGRAFÍA.....	43
ANEXO.....	49

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El aumento de población mundial trae consigo un mayor número de automóviles, industrias, maquinaria agrícola... o lo que es lo mismo, un mayor consumo energético. En la actualidad, la mayor parte de la energía consumida proviene de los combustibles fósiles, principalmente los derivados del petróleo, carbón y gas natural. El problema del consumo excesivo de los combustibles fósiles es la movilización de compuestos causantes del efecto invernadero que se encuentran inactivos en grandes reservas del subsuelo, como derivados de materia orgánica muerta. Debido al tamaño de estas reservas, su renovación natural es muy lenta (Atlas, M. & Bartha, R. 2002), pero la explotación humana favorece la reintroducción de CO₂ a la atmósfera de una manera artificialmente rápida, desplazando el equilibrio del ciclo del carbono hacia un punto que en la actualidad es desconocido pero que parece que puede traer grandes problemas climáticos debido, principalmente, a que las moléculas de CO₂ capturan la energía solar en la atmósfera aumentando así la temperatura media del planeta, esto es lo que se conoce como efecto invernadero. Además del carbono, otros ciclos biogeoquímicos se pueden ver afectados, tal es el caso del ciclo del nitrógeno e incluso el del azufre, cuyas emisiones atmosféricas son contaminantes (lluvia ácida, por ejemplo). Una buena solución para los problemas actuales de contaminación parece ser los biocombustibles derivados del metabolismo microbiano. La principal característica que tienen estos respecto a los combustibles fósiles es que el balance de CO₂ tiende a cero, es decir, no se está produciendo más carbono de reservas inactivas, sino que se está reciclando constantemente el carbono atmosférico, ya que los microorganismos emplean como fuente de carbono azúcares como, por ejemplo, la glucosa, fructosa o la sacarosa y en algunos casos el propio CO₂ para sintetizar los biocombustibles.

El problema de los biocombustibles puede ser su alto coste de producción, debido a que los microorganismos necesitan unas condiciones controladas para el crecimiento, medios de cultivo muy caros y maquinaria industrial de elevado coste de mantenimiento. Por todo esto, las investigaciones se han centrado en reducir los costes de producción, para ello se han investigado nuevos sustratos, nuevas formas de cultivo y nuevos microorganismos cuya capacidad metabólica sea alta y que puedan ser cultivados a bajo coste. Para obtener un biocombustible a bajo coste, se deberían tener en cuenta los parámetros reflejados en la tabla 1, en la que se muestran las características del biocombustible ideal.

Dentro de las principales líneas de investigación para producir biocombustibles, se encuentran la de producción de metano, biodiesel, butanol, isobutanol, etanol e hidrógeno. Se hará referencia a todos ellos en el presente trabajo, pero antes de empezar a presentar las principales investigaciones, es necesario saber por qué son estos los principales biocombustibles a nivel mundial, tanto en uso como en producción. Para que un combustible llame la atención de los investigadores lo

primero que debe tener es un alto calor de combustión, porque el resto de características se pueden cambiar artificialmente en la mayoría de los casos. Por ello en la tabla 2 se presentan las energías de combustión de los diferentes biocombustibles aquí estudiados, así como el de la gasolina, que se suele tomar de referencia, para comparar los biocombustibles con los combustibles fósiles.

Tabla 1: Características que debería reunir un biocombustible ideal

	CARACTERÍSTICAS
Microorganismos	Comunes en el medio ambiente. Eurioicos. Fáciles de cultivar. Fáciles de manipular genéticamente. Totalidad del genoma conocido.
Materia prima empleada como sustrato	Residuos agrícolas, industriales o de cualquier actividad humana. Muy contaminantes para el medio ambiente.
Método de cultivo.	Sin necesidad de control de las condiciones ambientales ([O ₂], pH, temperatura...)
Tipo de combustible	Alto calor de combustión. Fácil de transportar. Posibilidad de emplearlo en los motores actuales sin modificaciones. Posibilidad de mezclarlo con gasolina o diésel durante su uso.
Proceso de síntesis del combustible	Fijando CO ₂ atmosférico (ideal). Balance neto de CO ₂ igual a cero. Secreción del biocombustible al medio de cultivo.
Ventajas añadidas	Cualquier otra característica que abarate el coste del combustible.

Tabla 1: En esta tabla se presentan los principales puntos que se pueden controlar para mejorar la producción de los biocombustibles (columna de la izquierda) y las características ideales de estos para maximizar el proceso de síntesis (columna de la derecha).

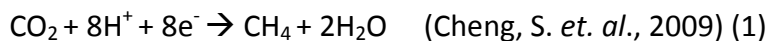
Tabla 2: Calor de combustión de los diferentes biocombustibles

COMBUSTIBLE	CALOR DE COMBUSTIÓN	Referencias
Hidrógeno	142 MJ/Kg	http://www.cubasolar.cu/biblioteca/energia/Energia20/HTML/articulo06.htm
Metano	55 MJ/Kg	http://www.cubasolar.cu/biblioteca/energia/Energia20/HTML/articulo06.htm
Gasolina	47 MJ/Kg	http://www.cubasolar.cu/biblioteca/energia/Energia20/HTML/articulo06.htm
Biodiesel	28-42MJ/Kg	Knothe, G. (2005)
Butanol	36.05MJ/Kg	Rajchenberg-Ceceña, E. <i>et. al.</i> , 2009
Isobutanol	33 MJ/Kg	http://en.wikipedia.org/wiki/Heat_of_combustion
Etanol	30 MJ/Kg	http://www.cubasolar.cu/biblioteca/energia/Energia20/HTML/articulo06.htm

METANO

Las principales ventajas del metano derivan de que es un combustible que puede proceder del metabolismo de diversos microorganismos, empleando diferentes medios de cultivo de bajo coste. Su calor de combustión es muy alto y su síntesis deriva de un ciclo de retroalimentación en el que se captura CO₂. Sus principales limitaciones derivan de la falta de conocimientos que hay sobre la posible manipulación genética de los microorganismos metanogénicos, que dificultan la mejora global del rendimiento de producción de metano.

Por lo tanto, la producción de metano se basa en el uso de microorganismos capaces de sintetizarlo a partir de CO₂, con lo que se consigue capturar carbono (aunque no fijarlo, ya que el C seguirá el ciclo representado en las ecuaciones 1 y 2), para ello, se pueden emplear microorganismos metanogénicos formando una biopelícula. El más estudiado es *Methanobacterium palustre* que emplea CO₂ e hidrógeno para producir metano (según la ecuación 1). Su eficiencia de producción de metano es alta (aproximadamente 80%).



Para una producción óptima de metano, se debe emplear una concentración de sustrato alta y permitir un tiempo suficiente de crecimiento (más de 40 horas), por lo tanto el aumento de la concentración de sustrato, así como un aumento en el tiempo de reacción, reportan mayores productividades en la síntesis de metano (Cheng, S. et. al., 2009). Las bacterias se pueden cultivar en células de electrólisis microbológicas (MEC) (Figura 1) que son similares a las células de combustibles microbianos (MFC), estas, son dispositivos que emplean las bacterias como catalizadores para oxidar materia orgánica e inorgánica y generar corriente (Logan, B. E. et. al., 2006) y se mantienen en anaerobiosis. En este caso, los MECs se modifican ligeramente para poder almacenar la energía eléctrica como biocombustibles (hidrógeno o metano), en un proceso conocido como electrometanogénesis, (Cheng, S.

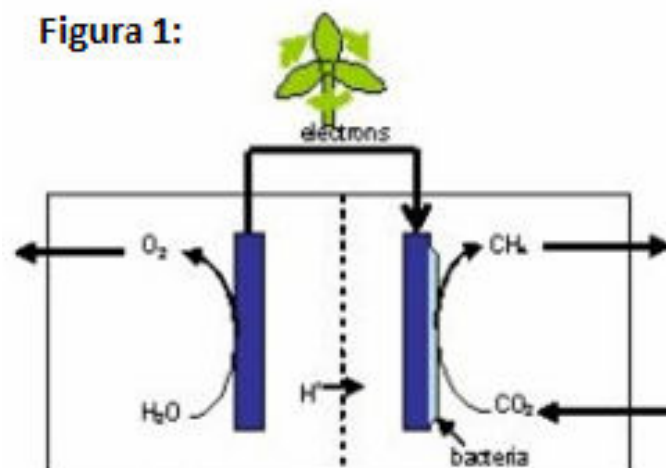
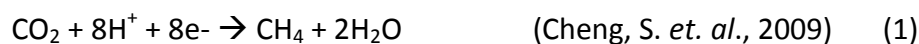


Figura 1: Representación esquemática de la célula de electrólisis bacteriana, MEC, y de su funcionamiento básico. (Extraída de: <http://www.wageningenur.nl/en/show/Methane-from-CO2-with-microbial-electrolysis.htm>)

et. al., 2009), parece lógico que, debido al mayor poder calorífico del hidrógeno (Tabla 2) este debe ser el combustible buscado en este tipo de experimentos, pero no es así, ya que el metano, tiene la ventaja añadida, como ya se ha dicho, de capturar moléculas de CO₂.

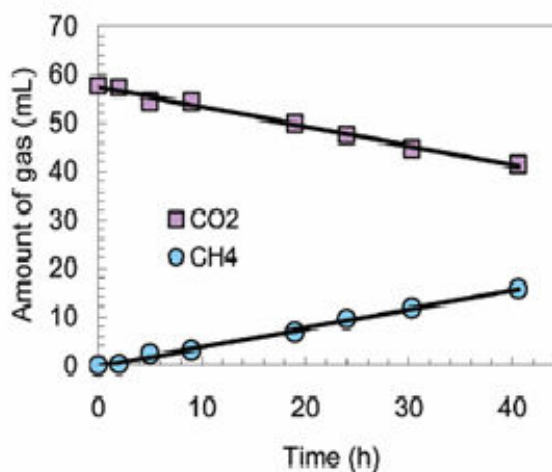
La biopelícula de microorganismos, principalmente de *M. palustra*, aunque también podemos encontrar *Methanoregula boonei* y *Methanobacterium palustre*, entre otros, se sitúa en el cátodo, sobre un electrodo de carbono, empleándolos como aceptores de electrones (Figura 1), mientras que en el ánodo encontramos solo H₂O. En conjunto tendremos el biocátodo (biopelícula y electrodo de carbono), medio de cultivo específico y CO₂ aplicado tras la adición de los otros componentes del cátodo.

Con este método se consigue una mayor producción que por cualquier otro método no biológico de producción de metano, además, al ser las propias bacterias las encargadas de captar electrones (en lugar de hierro como en investigaciones anteriores Cheng, S. et. al., 2009), la eficiencia aumenta hasta el 96% (con un metal la eficiencia ronda el 10% - 56%) por lo que la tasa de síntesis de metano también aumenta (Cheng, S. et. al., 2009). Por último, debemos tener en cuenta, que los productos finales serán metano y en bajas concentraciones hidrógeno, los electrones necesarios para reducir el CO₂ vienen de la oxidación del agua lo que requiere un pequeño gasto energético, menor que el de la combustión de metano, por ello la reacción global de síntesis de metano se calcula de la siguiente manera (la ecuación 4 es la ecuación global):



La mayor producción de metano que se ha reportado en este tipo de estudios ha sido de 17 mL en 40 h de cultivo (Gráfica 1) con una disminución equivalente de CO₂.

Gráfica 1:

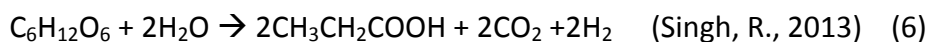
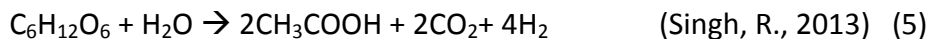


Gráfica 1: Extraída de: Cheng, S. et. al., 2009

HIDRÓGENO

El hidrógeno es un combustible con un alto poder calorífico, lo que le coloca como el principal sustituto a las energías fósiles. Encontramos diferentes métodos de producirlo e innumerables investigaciones estudiándolo, por ello se puede pensar que en un futuro no muy lejano este será el combustible más empleado a nivel mundial, además existen una gran variedad de microorganismos capaces de producirlo ya que el hidrógeno es el compuesto más abundante sobre la corteza terrestre y es un producto derivado del metabolismo de diversos compuestos. Precisamente por esto, es realmente complicado centrar la producción metabólica hacia la síntesis de H₂ ya que no existe una ruta metabólica cuyo producto final sea el hidrógeno.

Para la producción de hidrógeno destaca la fermentación oscura (sin necesidad de energía lumínica), llevada a cabo por un conjunto de microorganismos, dentro de los que se engloban, como principales productores, especies de *Clostridium* y *Bifidobacterium*. La fermentación oscura se basa en reducir protones (derivados del metabolismo de azúcares) para rendir hidrógeno. Según las ecuaciones 5 y 6, en condiciones anóxicas obtendremos H₂ con un rendimiento de 3 moles H₂/mol glucosa. (Singh, R., 2013). Si empleamos métodos combinados, en los que se lleva a cabo una fotofermentación y una fermentación oscura, el rendimiento asciende hasta 8 moles H₂/mol glucosa (Singh, R., 2013). Aun así, las mayores tasas de síntesis de hidrógeno se obtienen en biorreactores continuos con células inmovilizadas, en los que la producción asciende por encima de los 7600mL H₂/L x h con una tasa de retención hidráulica de 15 min (Singh, R., 2013).



BIODIESEL

El biodiesel representa una gran alternativa para los combustibles fósiles ya que actualmente ya se emplea como biocombustible en los motores de los automóviles modernos (Chisti, Y., 2007), su producción a partir de microorganismos está muy estudiada aunque también se puede producir a partir de plantas y animales. Existen normativas europeas de calidad de los ácidos grasos y su uso está más que probado. Las limitaciones en la síntesis de biodiesel se deben a la necesidad de maquinaria muy cara para el cultivo de las microalgas así como el uso de luz artificial (que encarece el proceso de síntesis de biodiesel) para mejorar el cultivo, por ello los cultivos suelen llevarse a cabo bajo la influencia de la luz solar en biorreactores diseñados para maximizar la captación de la energía lumínica.

Como ya se ha dicho, encontramos varias formas diferentes de producción de biodiesel empleando microorganismos, pero no parece rentable hacerlo a partir de plantas oleaginosas, ya que para abastecer a Reino Unido, por ejemplo, se necesitaría

ocupar más de la mitad de la isla con estos cultivos (Amaro, H. M. *et. al.*, 2011), ya que el rendimiento en aceite para las plantas oleaginosas oscila entre 172 - 5950 (L/ha) mientras que, con microalgas los datos oscilan entre 58700 - 136900 (L/ha) (Christi, Y., 2007).

En los métodos de producción de biodiesel a partir de microalgas, encontramos la ventaja de que se reduce mucho el espacio de cultivo, ya que en este caso se cultivan en grandes biorreactores pero, aunque parezca paradójico, las microalgas necesitan menores cantidades de agua que los cultivos de plantas oleaginosas, además las primeras pueden emplear, para crecer, aguas salobres (Amaro, H. M. *et. al.*, 2011) o incluso aguas residuales (Abou-Shanab, R.A.I. *et. al.*, 2013). En la actualidad parece complicado obtener grandes cantidades de biodiesel empleando cepas silvestres, por lo que muchas de las investigaciones se centran en buscar cepas modificadas genéticamente, capaces de producir una gran cantidad de lípidos. El problema es que los mecanismos de regulación de la expresión génica en microalgas están poco estudiados, por lo que resulta difícil la manipulación de la expresión génica de la ruta del metabolismo de lípidos (Amaro, H. M. *et. al.*, 2011). En ocasiones, es suficiente con modificar las condiciones medioambientales para obtener una mayor producción de lípidos, por ejemplo se consigue doblar la producción de lípidos solo con eliminar de nitrógeno a la población cultivada (Amaro, H. M. *et. al.*, 2011).

Como los factores ambientales pueden llegar a ser tan decisivos es muy importante elegir un biorreactor y un medio de cultivo que maximicen el metabolismo celular. Los medios de cultivo más recomendados son las aguas residuales, debido a que son contaminantes y necesitan un tratamiento para ser liberadas a la naturaleza de nuevo, sin embargo, si empleamos estas aguas como medios de cultivo, no será necesario llevar a cabo un tratamiento terciario porque las microalgas pueden crecer a partir de nitrógeno y fósforo inorgánicos muy abundantes en estos residuos (Abou-Shanab, R.A.I. *et. al.*, 2013), como se puede ver en la tabla 3.

Los reactores más empleados son los fotobiorreactores con tubos paralelos, con los que se consigue reducir el área de cultivo y los fotobiorreactores de tubos helicoidales, diseñados para el uso industrial, por su buen resultado a grandes volúmenes de biomasa.

Tabla 3:

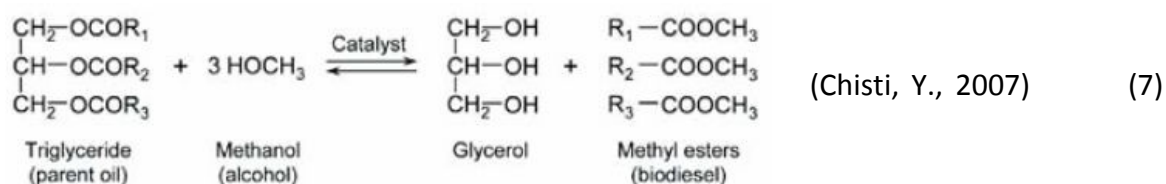
Physicochemical characteristics of piggery wastewater.

Parameters	Concentration
pH	8.4
TN (mg/L)	56 ± 2
NH ₄ -N (mg/L)	4.5 ± 0.4
NO ₃ -N (mg/L)	16.8 ± 0.9
NO ₂ -N (mg/L)	N.D. ^a
TP (mg/L)	13.5 ± 0.6
PO ₄ -P (mg/L)	11.4 ± 0.3
Total carbon (mg/L)	571 ± 8
Total inorganic carbon (mg/L)	336 ± 6
Total organic carbon (mg/L)	224 ± 5
Alkalinity (as CaCO ₃) (mg/L)	1780 ± 26
Electric conductivity (mS/cm)	6.3
Suspended solid (mg/L)	4.7
Potassium (mg/L)	1442 ± 11
Sodium (mg/L)	409 ± 5
Calcium (mg/L)	84 ± 4
Magnesium (mg/L)	19.7 ± 0.6
Iron (mg/L)	0.22
Copper (mg/L)	0.08
Manganese (mg/L)	0.04
Aluminum (mg/L)	0.04
Chromium (mg/L)	0.03
Nickel (mg/L)	0.03
Lead (mg/L)	N.D.

Tabla 3: Extraída de: Abou-Shanab R.A.I. *et. al.*, 2013

Las cepas con un mayor crecimiento sobre aguas residuales han sido de la especie *Chlamydomonas mexicana* (Abou-Shanab, R.A.I. *et. al.*, 2013) y *Scenedesmus obliquus* YSR01 (Abou-Shanab R.A.I. *et. al.*, 2011) en las que se han reportado productividades de síntesis de lípidos de 0.9 y 0.91 g/L respectivamente. En estas cepas también se han reportado las mayores concentraciones de ácidos grasos (especialmente ácido oleico C18 1n-9, que es el principal componente del biodiesel de mejor calidad), siendo por ello las mejores cepas para la producción de biodiesel de alta calidad.

Los lípidos no pueden ser empleados directamente como fuentes de biodiesel, sino que necesitan, primero ser extraídos del interior celular y posteriormente ser transesterificados para rendir ácidos grasos que sí que podrán ser empleados como fuentes de biodiesel. Para la extracción del biodiesel se suele llevar a cabo un proceso de centrifugación para obtener la masa celular, que posteriormente será sometida a un proceso de extracción de lípidos (Abdou-Shanab, R.A.I. *et. al.*, 2013). En el proceso de transesterificación (Ecuación 7), se pretende obtener ácidos grasos y separarlos del glicerol mediante una re-esterificación con un alcohol para garantizar su volatilidad (Amaro, H. M. *et. al.*, 2011), formando los ácidos grasos metil ésteres.



Por último, se propone como mejora económica, llevar a cabo un refinado del proceso (Figura 2) como ocurre con los combustibles fósiles, así se consiguen mayores beneficios, sin aumentar demasiado el coste de producción, ya que se emplea la biomasa resultante para producir más compuestos útiles para la industria (alimentación de ganado, metano...) y que pueden ser utilizados como fuente de energía para llevar a cabo todo el cultivo de las microalgas. Los compuestos sobrantes pueden ser vendidos para sufragar los demás gastos de producción (Chisti, Y., 2007).

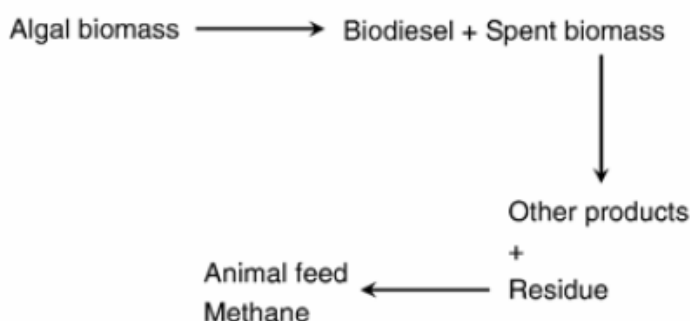


Figura 2: Biorrefinado de la biomasa sobrante en el proceso de síntesis de biodiesel. (Extraído de: Chisti, Y., 2007)

Se han estudiado más formas de producción de biodiesel, en las que se pretende trabajar con microorganismos cuyo genoma sea conocido y sean fáciles de

manipular. Los principales microorganismos estudiados han sido *Saccharomyces cerevisiae* (Ok Yu, K. *et. al.*, 2012) y *Escherichia coli* (Clomburg, J. M. & González, R, 2010).

Para la producción de biodiesel a partir de *S. cerevisiae* se pretende emplear cepas modificadas genéticamente en las que se sobre-expresa la ruta de síntesis de triacilglicerol (TAG) (Figura 3), que es utilizado como la materia prima en la producción de biodiesel (Ok Yu, K. *et. al.*, 2012). Para llevar a cabo esta súper producción de triacilglicerol es necesario sobre-expresar tres genes de la ruta de síntesis:

- *GUT 1*: Glicerol kinasa.
- *DGA 1*: Diacilglicerolacil transferasa.
- *LRO 1*: Diacilglicerolacil transferasa.

Con estas modificaciones se obtuvo una cepa de *S. cerevisiae* YPH499 (Δ GutDgaLro1) que sintetiza 23 mg/L de lípidos tras 96h. Aunque esta producción es muy baja comparada con los casos anteriores, las ventajas que presenta esta cepa son, el uso de glicerol como sustrato, así como los conocimientos que hay sobre la ruta de síntesis de TAG y posibilidades de modificarla.

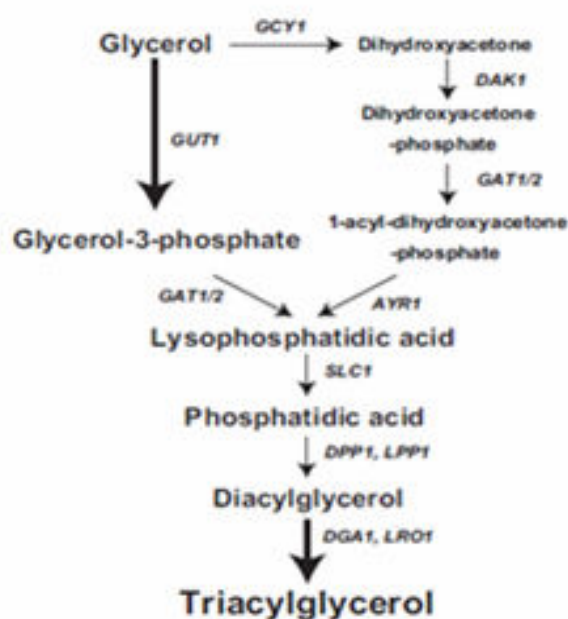


Figura 3: Ruta de síntesis de triacilglicerol por *S. cerevisiae*, a partir de un sustrato barato como es el glicerol, que además es producto sobrante tras de la transesterificación del triacilglicerol (retroalimentación positiva) (Extraído de: Ok Yu, K. *et. al.*, 2012)

Otra manera de producir biodiesel es a partir de cepas modificadas genéticamente de *E. coli* que metabolizan residuos lignocelulósicos para producir diversos biocombustibles (etanol, isopropanol, butanol y ácidos grasos) (Anexo I, ilustración 1 e Ilustración 2), aunque en esta sección, son de mayor interés los ácidos grasos. Para su síntesis fue necesario llevar a cabo un extenso trabajo de manipulación genética, con el objetivo de que la cepa pudiera crecer en medios ricos en diversos azúcares como xilosa, arabinosa, maltosa y lactosa (derivados de los residuos lignocelulósicos). La producción de biodiesel, se llevó a cabo gracias a una serie de modificaciones genéticas de distintas cepas de *E. coli*, obteniéndose como máxima producción 32mg/L de ácidos grasos etil ésteres (FAEE) en cepas en las que se sobre-expresaron los genes *FADD* y *TESA* (Acyl-CoAsintetasa y acyl-CoAtioesterasa, respectivamente) implicados en la ruta de conversión de ácidos grasos a ácidos grasos etil ésteres (útiles como biodiesel) (Anexo I, Ilustración 1). Aunque su concentración

final de FAEE es inferior al nivel requerido para ser industrialmente rentable, sí que se cree que esta especie puede constituir una forma rentable de producir biocombustibles en el futuro (Clomburg, J. M. & González, R., 2010).

BUTANOL

Es posible sintetizar butanol por rutas metabólicas microbianas, empleando microorganismos muy comunes en la naturaleza como es el caso del género *Clostridium* y de *Escherichia coli*, además la síntesis de butanol puede ser llevada a cabo a partir de sustratos baratos, como residuos lignocelulósicos (Kumar, M. & Gayen, K., 2011).

Dentro del género *Clostridium* encontramos varias especies capaces de producir butanol por la ruta fermentativa ABE (acetona-butanol-etanol). Estas cepas requieren de una manipulación genética, para dirigir la ruta fermentativa ABE a la producción exclusiva o casi exclusiva de butanol. Las propiedades del butanol (especialmente que es poco corrosivo y con una presión de vapor más baja que el etanol), lo hacen apto para los motores de combustión interna de los automóviles modernos (Rajchenberg-Ceceña, E. *et. al.*, 2009). El problema que encontramos con el butanol es que es muy tóxico para las células por lo que es necesario separarlo del resto del medio de cultivo para impedir la inhibición del crecimiento celular (Kumar, M. & Gayen, K., 2011; Rajchenberg-Ceceña, E. *et. al.*, 2009; Zheng, Y. *et. al.*, 2009), por ello el método de cultivo óptimo es el cultivo continuo (Kumar, M. & Gayen, K., 2011).

El principal problema de la modificación genética de *Clostridium* es que estas cepas degradan la mayoría de los genes exógenos, por lo que resulta complicado llevar a cabo su manipulación. Los principales objetivos de la manipulación genética son reducir la producción de metabolitos secundarios, así como construir cepas tolerantes al butanol. Se ha visto que los mejores sustratos para la producción de butanol son los residuos celulósicos y las melazas. Las mejores cepas para llevar a cabo la fermentación han sido de la especie *C. beijerinckii* (18-25g/L) sobre residuos celulósicos (Kumar, M. & Gayen, K., 2011) y la cepa *C. beijerinckii* BA101 (20g/L) sobre melazas de soja, suplementadas con glucosa y diversas sales inorgánicas (Quereshi, N. *et. al.*, 2001).

Para evitar los problemas de formación de subproductos de bajo interés industrial se han empleado cepas de *E. coli* como sistemas de expresión de genes heterólogos de *C. acetabotylicum* de la ruta de síntesis de butanol (Kumar, M. & Gayen, K., 2011; Rajchenberg-Ceceña, E., 2009). Los resultados han sido, la obtención de una cepa capaz de crecer y producir butanol en condiciones aeróbicas, (Kumar, M. & Gayen, K., 2011) además de producir 0.373 g/L de butanol en medio mínimo, suplementado con un 2% de glucosa (Rajchenberg-Cedeña, E. *et. al.*, 2009).

ISOBUTANOL

La producción microbiológica de isobutanol no está muy estudiada, pero cuenta con la gran ventaja de que se conoce perfectamente la ruta de síntesis de isobutanol en *E. coli*, además de que las cepas empleadas son muy comunes en la naturaleza y tienen la totalidad del genoma secuenciado, lo que facilita la manipulación genética.

Se han estudiado cepas de *E. coli* para la producción de isobutanol (en medio sintético M9 rico en glucosa, extracto de levadura, kanamicina, ampicilina y metales diluidos) ya que en *E. coli* encontramos el gen *YGHD* que codifica una amplia gama de alcohol deshidrogenasas (implicadas en el último paso de la ruta de síntesis del isobutanol) (Anexo I, Ilustración 1), por lo tanto su sobre-expresión favorece la producción de isobutanol (Atsumi, S. *et. al.*, 2010). Se encontró una producción de 20g/L de isobutanol en 112h en la cepa *E. coli* (JCL260) a la que se le insertaron dos plásmidos pSA65 y pSA129 que poseían el gen de la alcohol deshidrogenasa (Atsumi, S. *et. al.*, 2010).

ETANOL

El etanol es un combustible muy extendido a nivel mundial, ya que se emplea en los motores actuales, mezclado con gasolina. Su producción microbiológica está muy estudiada y extendida en ciertos países como Brasil y Estados Unidos (Carreón, O. E. *et. al.*, 2009). Las cepas empleadas están muy estudiadas, además se sabe que estas cepas pueden emplear diferentes sustratos de bajo coste como materia prima para la síntesis de etanol. El problema que se puede ver con el etanol es su dificultad para ser mezclado con gasolina, además su transporte debe ser independiente al de la gasolina ya que el etanol retiene partículas de agua, por lo que su mezclado se debe realizar en el momento de su uso.

El metabolismo del etanol se suele basar en rutas fermentativas, de diversos azúcares, con levaduras. También se puede presentar la producción de etanol a partir de CO₂ siendo las principales productoras bacterias fotosintéticas, cianobacterias principalmente. Para ello es necesario modificar genéticamente las bacterias, ya que es la única forma de obtener etanol a partir de la ruta de fijación de CO₂, el ciclo de Calvin. Se ha empleado la cepa *Synechococcus* sp. PCC6803 a la que se le ha insertado el gen de la piruvato descarboxilasa (*PDC*) de *Z. mobilis*, además se ha sobre-expresado la alcohol deshidrogenasa endógena (*SLR1192*) y se ha bloqueado la ruta de síntesis del poli-β-hidroxibutirato (PHB), con todo ello, se han reportado concentraciones de etanol de hasta 5.5 g/L (Gao, Z. *et. al.*, 2012).

En este trabajo, además de un estudio bibliográfico de la utilización de diferentes microorganismos para la producción de biocombustibles también se ha realizado un pequeño proyecto de investigación sobre la producción de bioetanol con levaduras. En concreto se han empleado dos cepas de *Kluyveromyces lactis* (GG799 y GG799 con el gen *MEL1* que codifica para la α-galactosidasa de *Saccharomyces*

Cerevisiae integrado en el genoma), que se han cultivado tanto en medios sintéticos con lactosa o rafinosa, como en medios complejos con suero de leche (procedente de la industria quesera y que resulta muy contaminante para el medio ambiente) o melazas (se denomina melaza al efluente final obtenido en la preparación de azúcar mediante una cristalización repetida, es una mezcla compleja de diferentes azúcares, siendo la sacarosa su principal componente) (Fajardo, E. S. & Sarmiento, S. C., 2007) obteniéndose unas concentraciones finales de etanol de 11 g/L (en lactosueros) y 5,7 g/L (en melazas). Estas cepas además de producir bioetanol en medios baratos, presentan la ventaja añadida de poder sintetizar enzimas de gran interés en la industria alimentaria como son la α -galactosidasa, la β -galactosidasa y la invertasa. Por esa razón también se ha estudiado la producción de esas enzimas tanto en medios sintéticos como en medios complejos.

2. OBJETIVOS

Los objetivos principales de este trabajo fueron los siguientes:

1. Realización de una búsqueda bibliográfica sobre producción microbiológica de biocombustibles y determinación en base a la bibliografía de cuáles son y/o cuáles podrían ser los biocombustibles capaces de sustituir a las energías fósiles como principal fuente energética.

2. Evaluación de dos cepas de *Kluyveromyces lactis*: la cepa silvestre GG799 y una variante de la misma, la GG799MEL1, que contiene el gen MEL1 que codifica para la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* integrado en su genoma, creciendo en medios sintéticos con lactosa o rafinosa y en medios complejos subproductos de la industria quesera, lactosuero, y de la industria azucarera, melazas, para la:

2.1. Producción de biomasa (crecimiento celular) en los diferentes medios.

2.2. Producción de etanol en los diferentes medios.

2.3. Producción de enzimas de interés industrial: la α -galactosidasa, la β -galactosidasa y la invertasa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas empleadas

Se ha empleado la cepa silvestre de *Kluyveromyces lactis* GG799 (*New England Biolabs*), cepa industrial que no presenta auxotrofías, y la cepa GG799MEL1 obtenida mediante técnicas de ingeniería genética en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña. La cepa GG799MEL1 presenta varias copias en tándem del gen MEL1 que codifica para la α -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* integradas en el genoma de la cepa silvestre GG799 dentro de la región promotora del gen LAC4 que codifica para la β -galactosidasa de *K. lactis*. La región promotora del gen LAC4 queda reconstituida tras la integración. La cepa así construida es capaz de expresar bajo el control del promotor LAC4, inducible por galactosa y reprimido por glucosa, tanto la proteína recombinante α -galactosidasa como la proteína nativa β -galactosidasa. La proteína recombinante α -galactosidasa es dirigida hacia la vía secretoria gracias a la señal de secreción del *mating- α* de *S. cerevisiae*, por lo que un porcentaje de la actividad de esta proteína se detectará en el medio extracelular mientras que la proteína que está siendo procesada y que por tanto aún no ha llegado al medio extracelular, se podrá detectar en el interior de las células. La proteína nativa β -galactosidasa es una proteína intracelular por lo que se determina la actividad intracelularmente. Tanto la cepa GG799 como la cepa GG799MEL1 producen y secretan al medio extracelular la proteína nativa invertasa, la cual es codificada por el gen INV1.

2.2 Medios y condiciones de cultivo

Las cepas se hicieron crecer tanto en medios sintéticos con lactosa o rafinosa, como en medios complejos de suero de leche (lactosuero) o melazas.

Previamente, se realizó, en todos los casos (excepto en los cultivos con rafinosa) un precultivo en 150 mL del medio sintético de glucosa, YPD (Peptona 2%, extracto de levadura 1% y glucosa 2%) durante tres días, en agitación orbital a 250 r.p.m y a 30°C, con ello se consigue que las células entren en crecimiento exponencial, pero sin inducirse la expresión del gen que codifica para la α -galactosidasa puesto que como se ha comentado anteriormente la presencia de glucosa reprime el promotor LAC4. Posteriormente se determinó la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro y se calculó los mililitros que se deberían inocular para tener una OD₆₀₀ de 0.1.

Los medios sintéticos con lactosa o rafinosa fueron elaborados de la misma forma que el medio sintético con glucosa:

YPL: Peptona 2%, extracto de levadura 1 % y lactosa 2%.

YPR: Peptona 2%, extracto de levadura 1% y rafinosa 2%.

En el caso del preinóculo para el cultivo en rafinosa, se realizó en medio YPL para inducir la expresión de la α -galactosidasa para que parte de esta enzima estuviese presente en el medio del cultivo al comienzo del mismo y así poder hidrolizar la rafinosa en galactosa y sacarosa.

El permeado del ultrafiltrado del suero de leche concentrado fue cedido por la fábrica de quesos denominada *QUEIZUAR, S. L.* (Bama, A Coruña). Una vez traídos de la fábrica, los sueros se almacenaron congelados a -20°C en alícuotas de un litro. Como paso previo a su utilización, inmediatamente tras ser descongelados se esterilizaron en autoclave (121°C durante 20 minutos), provocando la coagulación de la mayor parte de las proteínas. Para separar dichas proteínas, el suero se centrifugó en condiciones estériles (15 minutos a 10.000 r.p.m.). El sobrenadante así obtenido se usó como medio de cultivo.

La melaza de caña, de la casa *Santiveri*, se obtuvo comercialmente. Esta melaza, según indicaciones de la casa *Santiveri*, se obtiene por la concentración del jugo puro de la caña de azúcar y contiene un 80 % (p/p) de hidratos de carbono y un 1% (p/p) de proteínas. Para su utilización como medio de cultivo, se diluyó cuatro veces para lograr una concentración de azúcares de alrededor del 20%, se suplementó con sales: $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 1g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L y KH_2PO_4 1g/L y se esterilizó en autoclave.

Los cultivos se realizaron por duplicado en dos matraces (para cada cepa) con 20mL de cultivo y a una OD_{600} de 0.1, manteniéndose a 30°C en agitación orbital a 250rpm. Se tomaron muestras periódicamente para determinar el crecimiento, actividad enzimática, etanol y consumo de lactosa para el caso del suero de leche y glucosa para el caso de las melazas. En cada toma de muestras se tomó 1 mL del cultivo que se centrifugó (5000 r.p.m. durante 5 minutos) y se retiró el sobrenadante repartiéndolo en dos alícuotas de 500 μL en tubos *ependorff*. Uno de ellos se guardó a 4°C en la nevera para medir la actividad de las enzimas extracelulares, α -galactosidasa e invertasa. El otro se guardó a -20°C en el congelador para medir la producción de etanol y consumo de azúcares. El precipitado celular se guardó en el congelador a -20°C para realizar las medidas de actividad α y β -galactosidasa intracelular.

3.3 Medidas de actividad enzimática

2.3.1 Determinación cuantitativa de la actividad α -galactosidasa intracelular y extracelular con PNPG (p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido)

Las medidas de actividad α -galactosidasain vitro se llevaron a cabo utilizando el sustrato cromogénico p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (PNPG) (Sigma) siguiendo el método descrito por Ryan y colaboradores (Ryanet *al.*, 1998). El compuesto incoloro PNPG da lugar a un producto tras la hidrólisis que, a causa del cambio de pH producido al parar la reacción enzimática, adquiere un color amarillo cuantificable utilizando un espectrofotómetro y que es proporcional a la cantidad de sustrato liberado.

Para llevar a cabo las medidas de actividad intracelular se partió de 250 μL de cultivo de levaduras. Las células se decantaron por centrifugación y se resuspendieron en 250 μL de tampón de reacción (Hepes 20 mM pH 7,5, SDS 0,002% y DTT 10 mM); se añadieron 30 μL de cloroformo; se agitaron vigorosamente para permeabilizar las células, y se incubaron 10 minutos a 40°C. En el caso de la determinación de la actividad extracelular, se utilizaron volúmenes variables que fueron completados con el tampón de reacción (ácido cítrico 61 mM y Na_2HPO_4 77 mM pH 4) hasta 110 μL y se incubaron 10 minutos a 40°C. Tras la incubación a 40°C, necesaria para que la muestra alcance la temperatura óptima de reacción, se añadieron 110 μL de PNPG 10mM (preparado en tampón de reacción: ácido cítrico 61 mM y Na_2HPO_4 77 mM pH 4) y se recogieron alícuotas de 100 μL a diferentes tiempos (habitualmente 2 y 4 minutos). Para parar la reacción se añadieron los 100 μL de la reacción a un tubo ependorff con 100 μL de Na_2CO_3 1 M. Posteriormente se midió la absorbancia a 400 nm en un lector de placas.

La actividad α -galactosidasa se expresa en unidades enzimáticas; siendo la unidad enzimática (U.E.) la cantidad de enzima que libera un μmol de p-nitrofenol por minuto en las condiciones del ensayo (U.E.= $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$). Para el cálculo se siguió la siguiente fórmula:

$$AE = [\Delta\text{Abs}_{400} / \Delta T^{\circ} \times V \times \epsilon] \times VR \times FD = \text{U.E.}/\text{mL} = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$$

Donde $\Delta\text{Abs}_{400} / \Delta T^{\circ}$ es el incremento de absorbancia por unidad de tiempo (min^{-1}), V es el volumen de cultivo en mL y ϵ es el coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol a 400 nm ($18200 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). VR es el volumen total de la reacción en mL y FD da cuenta del factor de dilución aplicado a la muestra para realizar la medida.

2.3.2 Determinación cuantitativa de la actividad β -galactosidasa

Se utilizó el método de Guarente (1983) con ligeras modificaciones. La actividad enzimática se midió siguiendo la liberación de o-nitrofenol (ONP) a partir del sustrato sintético o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG).

Para medir la actividad en células libres, 250 μL de células fueron centrifugadas 5 minutos a 5.000 r.p.m., se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado una vez con tampón Z (Na_2HPO_4 100 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1,6 mM y 2,7 ml de β -mercaptoetanol por litro de disolución, pH 7), resuspendiéndose posteriormente en 250 μL del mismo. A continuación, se le añadieron 11 μL de cloroformo y 17,5 μL de SDS al 0,1% que actúan como agentes permeabilizantes. Se agitó fuertemente en *vortex* durante 30 segundos y se preincubó a 40°C durante 10 minutos al cabo de los cuales se añadieron 44 μL de la solución de sustrato (4 mg/ml de ONPG en agua destilada) y se dejó que la reacción se desarrollase, a la misma temperatura, hasta la aparición del color amarillo característico del producto (2-4 minutos).

A partir de este momento, se sacaron dos alícuotas de 100 μl a intervalos de tiempo controlados desde la adición del sustrato. La reacción se detuvo añadiendo dichas alícuotas sobre 100 μl de carbonato sódico 1 M contenidos en un tubo *ependorf*.

La mezcla se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos para separar las células. En el sobrenadante, se determinó espectrofotométricamente el o-nitrofenol liberado, por medida de la absorbancia a 420 nm. La concentración se calcula usando un coeficiente de extinción molar de $4.500 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Inchaurredo *et al.*, 1994).

Se definió la Unidad Enzimática (U.E.) como la cantidad de enzima que libera un μmol de o-nitrofenol por minuto en las condiciones del ensayo. Las unidades se dan como U.E./ml de medio de cultivo.

3.3.3 Determinación cuantitativa de la actividad invertasa

La medida de actividad invertasa se llevó a cabo mediante el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (Bernfeld, 1951), esta técnica se basa en la reducción del DNS por parte de algún azúcar reductor presente en la muestra a estudiar, para ello es necesario que la sacarosa, disacárido no reductor, sea hidrolizado previamente en los dos monosacáridos que lo forman: glucosa y fructosa, ambos reductores. La invertasa presente en la muestra es capaz de hidrolizar la sacarosa.

El método del DNS consiste en mezclar 1 ml de muestra con 1 ml de reactivo (100 ml de reactivo DNS contiene: 1 g de Ácido 3,5-dinitrosalicílico, 30 g de Tartrato Na-K-4H₂O y 20 ml de NaOH 2N). La mezcla se trata 5 minutos en baño de agua a ebullición, se deja enfriar a temperatura ambiente, se añade 10 ml de agua destilada y se mide la absorbancia a 540 nm frente a un blanco en el que la solución a valorar se sustituye por agua destilada.

El calibrado se lleva a cabo sobre una serie de diluciones preparadas a partir de una solución acuosa de glucosa. Un intervalo de concentraciones adecuado es 0,25-2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Para la representación de los datos se realiza una recta de regresión que enfrente la absorbancia a 540 nm frente a la concentración de glucosa.

Para medir la actividad invertasa se preparan 50 μL de sacarosa y 10 μL de nuestra muestra o dilución de la misma, se añaden además 50 μL de tampón acetato sódico 0.1M, pH 5. Tras 10 minutos de reacción se le añade el DNS, se hierve 5 min a 100°C y se detiene la reacción en hielo, posteriormente se mide la absorbancia a 540 nm. Se deben hacer dos blancos en uno solo se le añade la sacarosa, en el otro solo se añade la muestra con la enzima invertasa.

Se definió la Unidad Enzimática (U.E.) como la cantidad de enzima que libera un mg de glucosa por minuto en las condiciones del ensayo. Las unidades se dan como U.E./ml de medio de cultivo.

3.4 Determinación del consumo de azúcares

La determinación del consumo de azúcares solo se ha llevado a cabo en los medios complejos de suero de leche y melazas. La medida en el suero de leche se ha hecho por el método del DNS pero en este caso como la lactosa es un azúcar reductor no es necesario llevar a cabo ninguna hidrólisis previa, llega con preparar una disolución de nuestra muestra y añadirle DNS (en una proporción 1:1), en este caso es necesario hacer una recta patrón con una solución de lactosa (6 g/L).

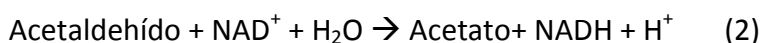
Para realizar la medida de consumo de azúcares en la melaza se ha empleado la técnica de determinación de carbohidratos totales (reacción del fenol-sulfúrico), ya que en la melaza hay gran variedad de azúcares, reductores y no reductores. La determinación de carbohidratos totales se basa en la reacción del furfural, el método aplicado (Dubois *et al.*, 1956, según se describe en Strickland & Parsons, 1968), consiste en una valoración de los monosacáridos presentes en la muestra a estudiar, más los obtenidos a través de la hidrólisis ácida de los disacáridos.

Para ello, es necesario mezclar nuestra muestra (200µL de muestra o dilución de la muestra) con igual volumen de una solución acuosa (50 mg/ml) de fenol y posteriormente añadirle 1000 µl de una solución (5 mg/ml) de sulfato de hidracina (N₂H₄-H₂SO₄) en ácido sulfúrico concentrado (el sulfato de hidracina evita la oxidación espontánea del fenol en la mezcla de reacción, por ello es imprescindible que se le añada rápidamente). Como es una reacción altamente exotérmica se debe dejar enfriar a temperatura ambiente y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 490 nm frente a un blanco en el que la solución a valorar se sustituye por agua destilada.

El calibrado se lleva a cabo mediante una serie de diluciones preparadas a partir de una solución acuosa de glucosa. Un intervalo de concentraciones adecuado es 12-125 mg/ml.

3.5 Determinación de la concentración de etanol

Para la medida de la concentración de etanol en el medio extracelular se ha empleado un *kit* comercial (*Nzytech genes and enzymes*), en el cual se cuantifica la cantidad de etanol por un método colorimétrico, en este método se pretende llevar a cabo las siguientes reacciones:



Este método se basa, por tanto, en la oxidación, en condiciones alcalinas, del etanol a acetaldehído en presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa por el dinucleótido de nicotinamina-adenina (NAD). El acetaldehído formado es,

posteriormente, oxidado por la enzima aldehído deshidrogenasa generando acetato y NADH.

La cantidad de NADH formado en las dos reacciones está en una relación estequiométrica con respecto al etanol presente en la muestra. El incremento en NADH se determina midiendo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm. Se procedió siguiendo las instrucciones del proveedor.

Es importante que primero se lleve a cabo la reacción 2 para evitar sobreestimar la cantidad de etanol presente en nuestra muestra, porque en ella puede haber acetaldehído derivado del metabolismo celular (la absorbancia de la primera medida se debe restar a la de la segunda medida). También es importante evitar la contaminación, para ello es recomendable trabajar en zonas donde no se haya estado trabajando con etanol.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento en un medio sintético con lactosa

Dado que tanto la cepa silvestre de *Kluyveromyces lactis* GG799 como la cepa GG799MEL1 son capaces de producir β -galactosidasa y por tanto pueden crecer en medios con lactosa, se comenzó evaluando el crecimiento, producción de enzimas y de etanol de estas cepas en medios sintéticos con este disacárido.

Se puede observar en la figura 1 que la modificación genética introducida en la cepa GG799MEL1 no mejora el crecimiento en un medio sintético con lactosa, de hecho se aprecia un mejor crecimiento de la cepa silvestre GG799 alcanzando una densidad óptica máxima de ($OD_{600}=62$), esto es debido a que la inserción en el genoma de la cepa GG799 del gen MEL1 que codifica para la enzima α -galactosidasa no ofrece ningún tipo de beneficio para degradar la lactosa. Teniendo en cuenta que el crecimiento ha sido ligeramente superior en la cepa silvestre respecto a la mutante, se podría pensar que la actividad β -galactosidasa sea más baja en la cepa mutante que en la silvestre como efectivamente se ha podido comprobar (Figura 2). Las diferencias en la actividad β -galactosidasa (54 U.E/ml como máximo para la cepa silvestre y 15 U.E/ml como máximo para la cepa mutante) podrían explicar esta diferencia en el crecimiento. El descenso en la producción de β -galactosidasa en la cepa mutante podría ser debido a un incremento en la producción de invertasa unido a la producción heteróloga de la α -galactosidasa.

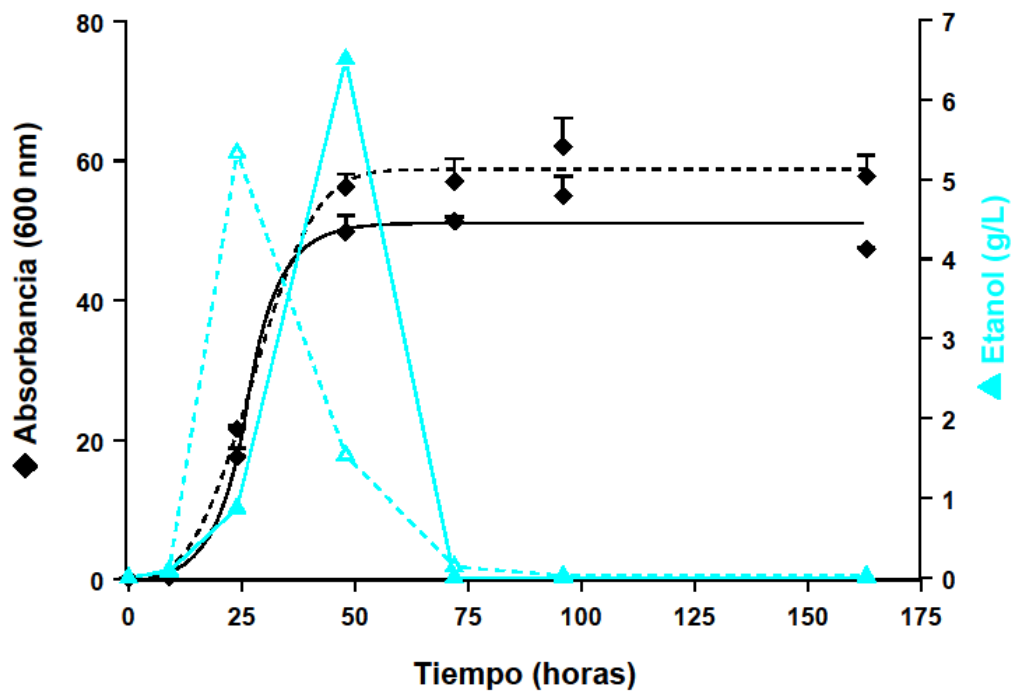


Figura 1: Crecimiento (en negro) y producción de etanol (g/L) (en cian) por la cepa silvestre GG799 (trazo discontinuo) y la cepa GG799MEL1 (trazo continuo) creciendo en un medio sintético con lactosa. Las barras de error estándar representan la media de tres experimentos.

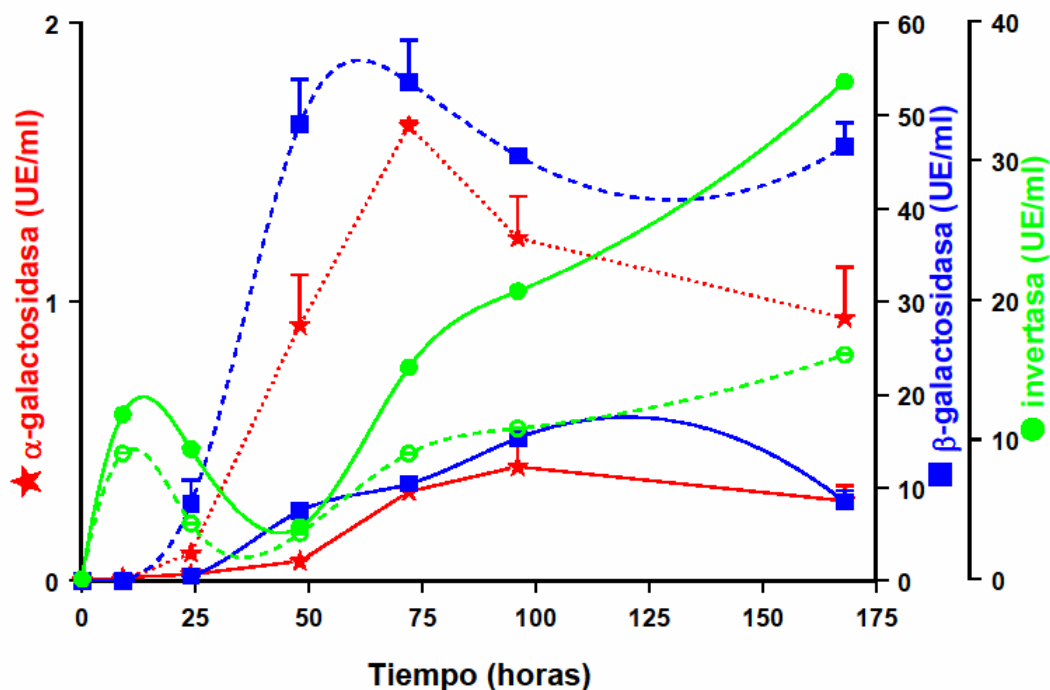


Figura 2: Producción de β -galactosidasa (azul) e invertasa (verde) por la cepa silvestre GG799 (trazo discontinuo) y la cepa GG799MEL1 (trazo continuo) creciendo en un medio sintético con lactosa. Así mismo, se representa la producción de α -galactosidasa (rojo) intracelular (trazo discontinuo) y extracelular (trazo continuo) por la cepa GG799MEL1 creciendo en un medio sintético con lactosa. Las barras de error estándar representan la media de tres experimentos.

Una de las ventajas que presenta la cepa mutante, es la secreción de la enzima α -galactosidasa al medio extracelular, como se puede ver (Figura 2), la actividad extracelular (0.41 U.E/ml) es menor que la intracelular (1.6 U.E/ml). Si sumamos ambas, las unidades enzimáticas obtenidas para la α -galactosidasa son bajas comparadas con las obtenidas para la β -galactosidasa (máximo 15 U.E/ml) y la invertasa (máximo 36 U.E/ml) en la cepa mutante. En la medida de actividad invertasa encontramos un patrón común para ambas cepas, un descenso de actividad enzimática al cabo de las 48 h, esto podría ser debido a que durante la fase de crecimiento exponencial las células consumen la lactosa presente en el medio sin necesidad de sintetizar invertasa, por lo que su expresión estaría reprimida, una vez que la lactosa disminuye su concentración, la expresión de invertasa vuelve a ser inducida, siendo mayor la inducción en la cepa mutante, de ahí que se observe un aumento en su actividad tras las 48 primeras horas.

A pesar de que la cepa GG799MEL1 presenta un menor crecimiento y menor producción de β -galactosidasa intracelular que la cepa silvestre GG799, la síntesis de etanol ha sido mayor en la cepa mutante (6.5 g/L) que en la silvestre (5.33 g/L), se puede ver por lo tanto que la cepa mutante es mejor productora de etanol que la cepa

silvestre en este medio. El menor crecimiento de la cepa mutante podría estar relacionado con una mayor producción de etanol.

Crecimiento en un medio sintético con rafinosa

Para comprobar si la integración del gen *MEL1* en la cepa GG799 suponía una ventaja para el crecimiento de la misma en medios ricos en azúcares hidrolizables por la α -galactosidasa se decidió realizar un cultivo de ambas cepas en medios sintéticos con rafinosa. La rafinosa es el trisacárido α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructofuranosa, por tanto tiene una galactosa unida a la sacarosa mediante un enlace α -glicosídico que es reconocido e hidrolizado por la α -galactosidasa. Como se puede observar (Figura 3) el crecimiento de la cepa mutante ha sido muy alto comparado con la cepa silvestre alcanzando una $OD_{600} = 70$, que es aún mayor que la que se alcanzó en el medio sintético con lactosa. Sin embargo, la cepa silvestre presenta menos de la mitad del crecimiento ($OD_{600} = 30$) que la cepa mutante, esto es debido a que el azúcar presente en el medio, la rafinosa, no es hidrolizable por la cepa silvestre, que carece de α -galactosidasa, por lo que su crecimiento se puede basar a partir de la peptona y el extracto de levadura presente en el medio o a partir de una hidrólisis parcial de la rafinosa durante el proceso de esterilación en el autoclave.

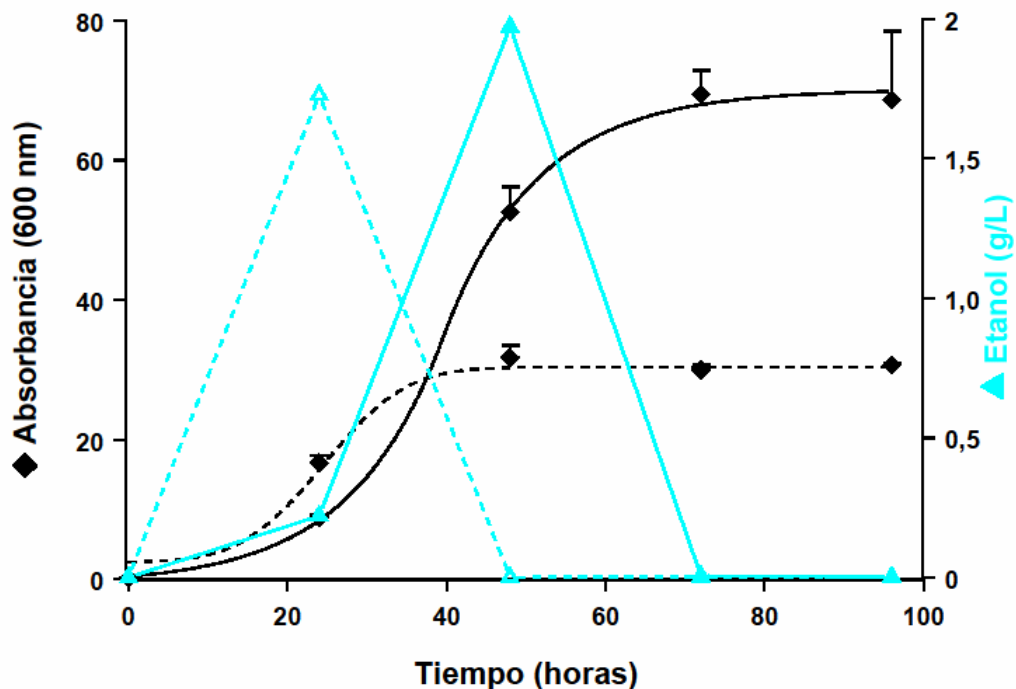


Figura 3: Crecimiento (en negro) y producción de etanol (g/L) (en cian) por la cepa silvestre GG799 (trazo discontinuo) y la cepa GG799MEL1 (trazo continuo) creciendo en un medio sintético con rafinosa. Las barras de error estándar representan la media de tres experimentos.

La actividad total de la α -galactosidasa (sumada la actividad intra y extracelular) es ligeramente mayor (Figura 4) que la obtenida con el crecimiento en un medio con lactosa dado que esta actividad es necesaria para hidrolizar la rafinosa presente en el medio y esto le permite duplicar el crecimiento a la cepa mutante con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, no hay que olvidar que la expresión de la α -galactosidasa está regulada por el promotor *LAC4* inducible por lactosa y por ese motivo no se alcanzan niveles superiores de expresión.

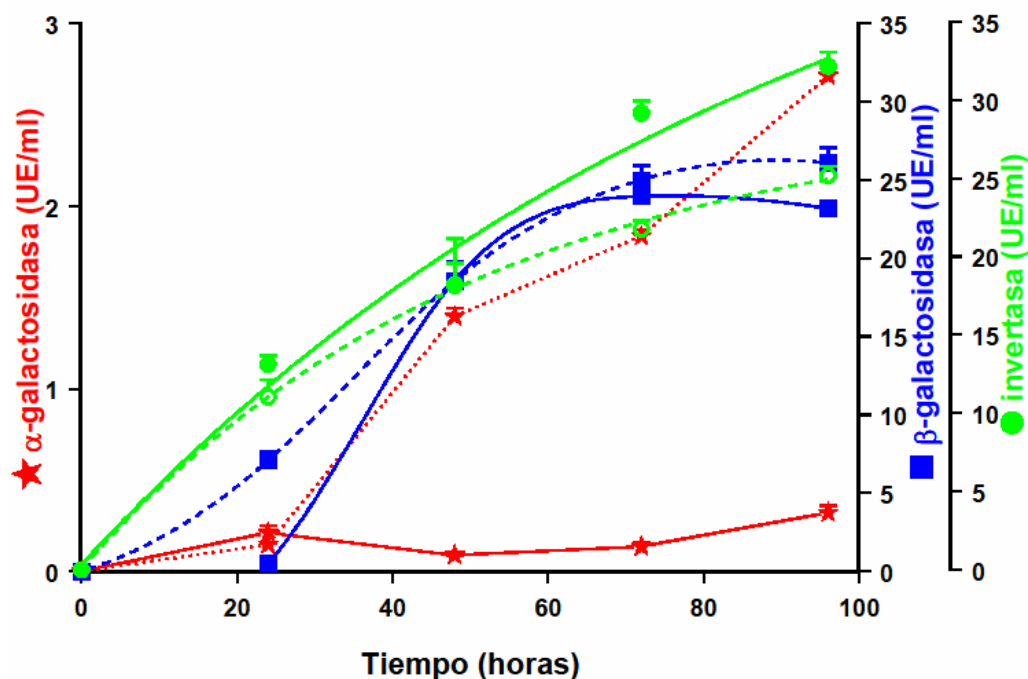


Figura 4: Producción de β -galactosidasa (azul) e invertasa (verde) por la cepa silvestre GG799 (trazo discontinuo) y la cepa GG799MEL1 (trazo continuo) creciendo en un medio sintético con rafinosa. Así mismo, se representa la producción de α -galactosidasa (rojo) intracelular (trazo discontinuo) y extracelular (trazo continuo) por la cepa GG799MEL1 creciendo en un medio sintético con rafinosa. Las barras de error estándar representan la media de tres experimentos.

La cepa silvestre presenta una ligera mayor actividad β -galactosidasa que la cepa mutante (Figura 4), que es mayor si se tiene en cuenta la actividad β -galactosidasa por célula ya que el crecimiento es menor en la cepa silvestre.

La actividad invertasa también es más alta en la cepa mutante que en la silvestre, siendo su actividad mayor hacia las últimas horas de cultivo, esto es debido a que según se va hidrolizando la rafinosa, se libera galactosa y sacarosa, la galactosa es metabolizada y la sacarosa es hidrolizada por la invertasa dando lugar a glucosa y fructosa que van a ser utilizados por la levadura para su crecimiento. También se observa que la actividad invertasa de la cepa silvestre en un medio con rafinosa es mayor que la obtenida por la misma cepa creciendo sobre lactosa, esto podría ser debido, como se ha explicado previamente, a que parte de la rafinosa pueda haber sido hidrolizada en el proceso de esterilización habiendo trazas de sacarosa y galactosa

lo que permitirían un incremento en la expresión de la invertasa en este medio y posibilitarían el crecimiento de la cepa silvestre.

La producción de etanol en ambas cepas ha sido menor que en el medio sintético con lactosa (Figura 3). En la cepa silvestre la producción de etanol alcanza los 1.7 g/L a las 24 horas mientras que en la cepa mutante se alcanzan los 1.97 g/L de etanol a las 48 horas. En ambas cepas se observa que la producción de etanol está ligada al crecimiento exponencial, cuando las células están creciendo más rápido y por tanto se ve favorecido el metabolismo fermentativo.

Crecimiento en un medio complejo con lactosa, ultrafiltrado de lactosuero

Teniendo en cuenta estos resultados se decidió comprobar el crecimiento, producción de enzimas y etanol en medios complejos como el lactosuero, un subproducto de la industria quesera, y las melazas de caña, subproducto de la industria azucarera. El lactosuero utilizado fue un ultrafiltrado concentrado hasta una concentración de azúcar inicial (lactosa) de 374 g/L. Esta elevada concentración de azúcares parece haber inhibido el crecimiento celular, presentando la cepa silvestre una $OD_{600}=16.6$ a las 168 h de cultivo y la cepa mutante una $OD_{600}=16.7$ (Figura 5) a las mismas horas, un crecimiento menor que el obtenido en un medio sintético con lactosa.

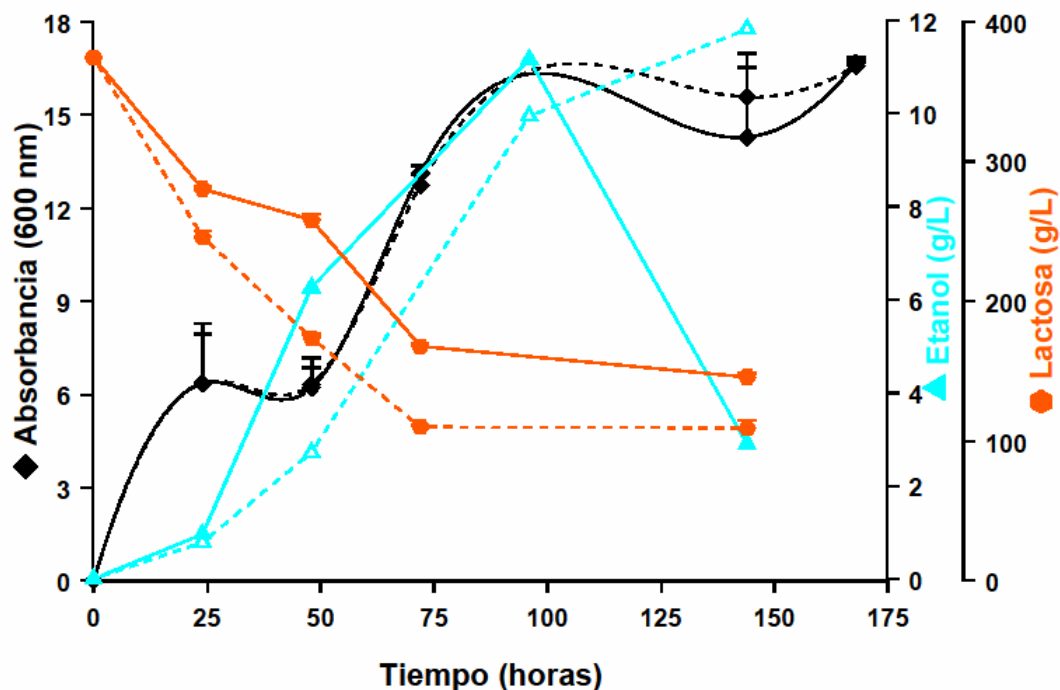


Figura 5: Crecimiento (en negro), producción de etanol (g/L) (en cian) y consumo de lactosa (g/L) (naranja) por la cepa silvestre GG799 (trazo discontinuo) y la cepa GG799MEL1 (trazo continuo) creciendo en lactosuero. Las barras de error estándar representan la media de tres experimentos.

Las dos cepas presentan un patrón similar de crecimiento y parecen presentar un crecimiento diauxico, consumen primero la glucosa procedente de la hidrólisis de la lactosa para posteriormente utilizar la galactosa. Este crecimiento diauxico no se observa cuando crecen en un medio sintético con lactosa. La lactosa presente en el medio se reduce a prácticamente la mitad después de 72 horas.

La actividad enzimática α -galactosidasa y β -galactosidasa presentan una disminución con respecto a los medios sintéticos (Figura 6), sin embargo, la actividad invertasa es incluso superior a la alcanzada en los medios sintéticos, manteniendo cerca del doble de actividad invertasa en la cepa mutante (44 U.E/ ml a las 144 horas) que en la silvestre (20.5 U.E/ml a las 144 horas). La existencia de un inhibidor de la β -galactosidasa en el suero de leche ha sido citada en otros trabajos (Richmond *et al.*, 1981) y podría ser la causa de la bajada de la actividad β -galactosidasa para las dos cepas ensayadas.

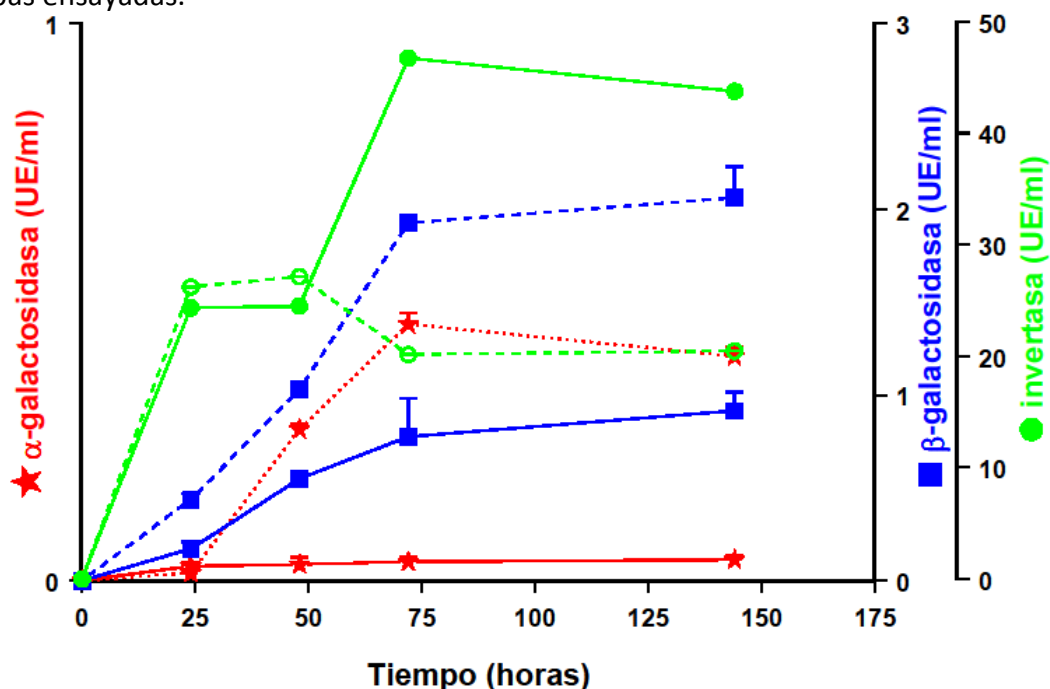


Figura 6: Producción de β -galactosidasa (azul) e invertasa (verde) por la cepa silvestre GG799 (trazo discontinuo) y la cepa GG799MEL1 (trazo continuo) creciendo en lactosuero. Así mismo, se representa la producción de α -galactosidasa (rojo) intracelular (trazo discontinuo) y extracelular (trazo continuo) por la cepa GG799MEL1 creciendo en lactosuero. Las barras de error estándar representan la media de tres experimentos.

Mientras que en los medios sintéticos se observa que la máxima producción de etanol se centra en las primeras horas de crecimiento, durante la fase exponencial, y una vez que se agotan los azúcares del medio las células empiezan a metabolizar el etanol, por ello su concentración en el medio disminuye hasta ser metabolizado totalmente. En los cultivos en lactosuero, ambas cepas retrasan la síntesis de etanol hasta las 100 horas (Figura 5), pero en este caso la síntesis es mucho mayor alcanzando

los 12 g/L en la cepa silvestre y los 11 g/L para la cepa mutante. El exceso de azúcares parece favorecer el metabolismo fermentativo.

Crecimiento en un medio complejo con rafinosa, melaza de caña

Por último, se comprobó el crecimiento y producción de enzimas y etanol en un subproducto procedente de la industria azucarera, la melaza de caña que en nuestro caso lo hemos obtenido comercialmente. En la melaza de caña se encuentran gran cantidad de azúcares fermentables, entre ellos rafinosa, glucosa, fructosa y sacarosa (Fajardo, E. E. & Sarmiento, S. C., 2007), pero carece de sales, por lo que se debe suplementar el medio con sales como se ha explicado en la sección de materiales y métodos. Debido a que la concentración de azúcares es muy alta se hizo una dilución 1:4 del medio en agua destilada, obteniendo una concentración de azúcares totales al inicio del cultivo de 252 g/L. En estas condiciones se observa (Figura 7) que el crecimiento disminuye con respecto al medio sintético con rafinosa para la cepa mutante ($OD_{600} = 29$ en melazas frente a una $OD_{600} = 69$ en rafinosa), mientras que prácticamente se mantiene para la cepa silvestre ($OD_{600} = 28$ en melazas frente a una $OD_{600} = 30$ en rafinosa). Se puede apreciar una pequeña diferencia en el crecimiento entre la cepa silvestre y la mutante, esto se puede deber a que la cepa mutante es capaz de emplear la rafinosa de la melaza para crecer. Es posible que el exceso de azúcares en el medio haya limitado el crecimiento celular, al igual que lo que pasaba con el cultivo en lactosueros. La cepa silvestre puede crecer a expensas de la glucosa, fructosa y sacarosa presentes en el medio.

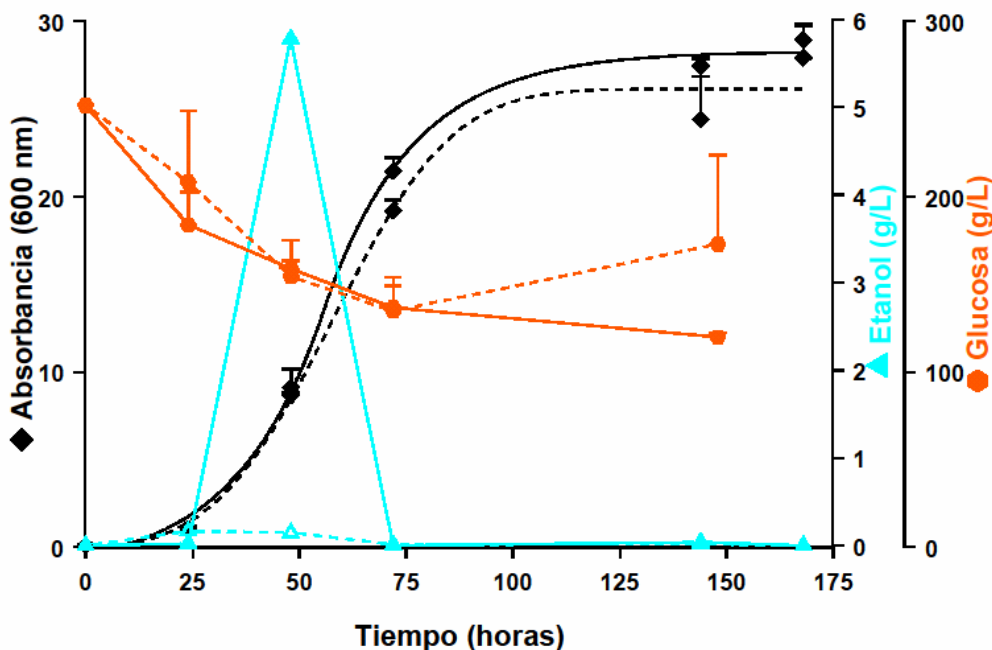


Figura 7: Crecimiento (en negro), producción de etanol (g/L) (en cian) y consumo de glucosa (g/L) (naranja) por la cepa silvestre GG799 (trazo discontinuo) y la cepa GG799MEL1 (trazo continuo) creciendo en melazas. Las barras de error estándar representan la media de tres experimentos.

La actividad α -galactosidasa global disminuye en el medio complejo (melaza) (Figura 8) respecto al medio sintético (rafinosa) (Figura 4), esto se puede deber a que en el medio sintético el único azúcar presente es la rafinosa, por lo que el crecimiento celular depende de su hidrólisis. En el caso de las melazas, la rafinosa representa un porcentaje muy bajo del total de azúcares, por lo que las levaduras pueden hidrolizar otros azúcares antes de la rafinosa. Se sigue observando que la actividad α -galactosidasa intracelular es mucho mayor que la actividad extracelular, aunque en este caso la actividad α -galactosidasa intracelular por célula es mucho mayor que en el medio sintético con rafinosa ya que el número de células también es menor.

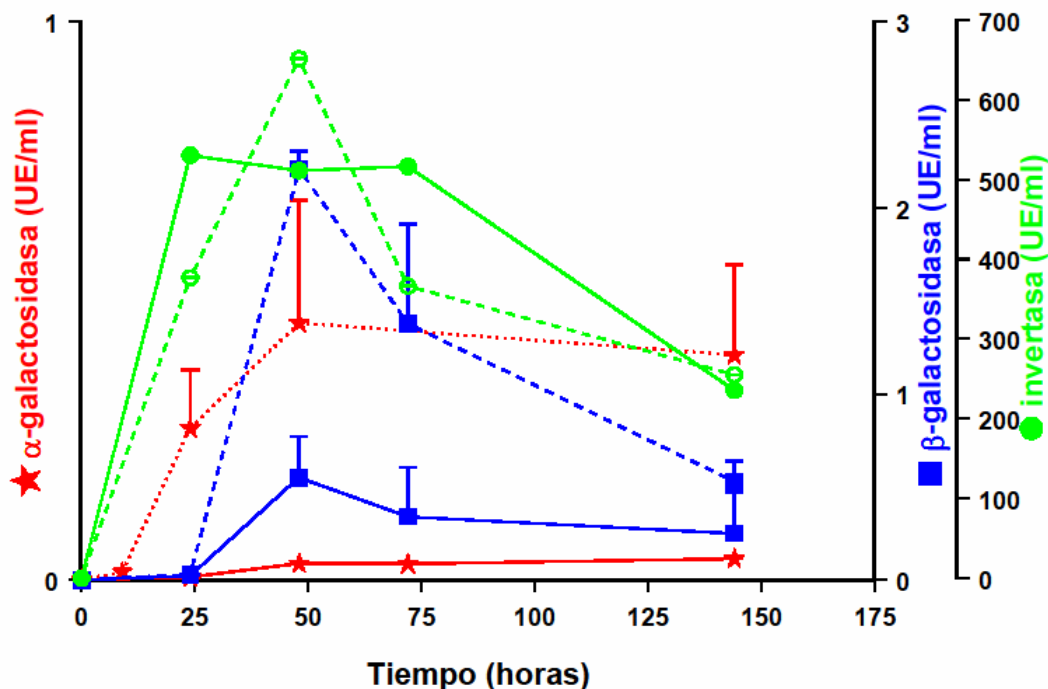


Figura 8: Producción de β -galactosidasa (azul) e invertasa (verde) por la cepa silvestre GG799 (trazo discontinuo) y la cepa GG799MEL1 (trazo continuo) creciendo en melazas. Así mismo, se representa la producción de α -galactosidasa (rojo) intracelular (trazo discontinuo) y extracelular (trazo continuo) por la cepa GG799MEL1 creciendo en melazas. Las barras de error estándar representan la media de tres experimentos.

La actividad β -galactosidasa, sigue el mismo patrón que en los medios anteriores, siendo superior en la cepa silvestre (2.2 U.E/ml) que en la mutante (0.5 U.E/ml).

Por lo que respecta a la actividad invertasa es casi diez veces superior a la que se ha observado en los otros medios, lo que podría indicar que la sacarosa es el azúcar mayoritario del medio (induciendo a la invertasa) y que la glucosa presente en la melaza debe estar en baja concentración ya que esta inhibe la expresión de la invertasa. Como se puede ver (Figura 8), en las últimas horas de cultivo disminuye la actividad invertasa, esto podría ser debido a que la invertasa hidroliza la molécula de sacarosa en galactosa y glucosa, y por lo tanto a medida que el crecimiento celular se

ralentiza se comienza a acumular glucosa en el medio, que reprimiría la expresión de la invertasa.

La síntesis de etanol (Figura 7) para la cepa mutante se ha triplicado en el medio complejo respecto al medio sintético con rafinosa, obteniéndose una concentración máxima de 5.8 g/L. Mientras que para la cepa silvestre solo se aprecian trazas de etanol. Se vuelve a observar el mismo patrón obtenido en los medios sintéticos, la síntesis de etanol se produce durante el crecimiento exponencial, durante esta etapa de crecimiento rápido se favorece el metabolismo fermentativo.

Perspectivas futuras

En este estudio se ha evaluado la síntesis de etanol en diferentes medios de cultivo con dos cepas de *K. lactis*, observándose que la producción de etanol en los medios complejos, subproductos de diferentes industrias, ha sido más elevada comparada a los medios sintéticos, convirtiéndose por tanto, en una fuente renovable de producción de biocombustibles. Para futuras investigaciones se debería controlar las diferentes condiciones ambientales, como el pH y sobre todo la concentración de O_2 ya que, las cepas de *K. lactis* presentan un metabolismo preferentemente oxidativo, por lo que para favorecer el metabolismo fermentativo deberían crecer en hipoxia (baja concentración de O_2). Además, habría que realizar un escalado de los cultivos para poder estudiar el comportamiento celular (respecto a la síntesis de etanol) en biorreactores industriales y estudiar tanto la productividad a nivel industrial como la rentabilidad económica.

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este trabajo son:

1. Tras haber realizado una búsqueda bibliográfica relacionada con la producción de biocombustibles por microorganismos, se puede afirmar que:

1.1. Actualmente el etanol se posiciona como el principal biocombustible tanto en producción como en consumo a nivel mundial. Esto es debido a que los principales microorganismos productores de etanol se emplean en la industria desde hace muchos años, por lo que su escalado y su adaptación industrial están garantizados, además los principales sustratos que se emplean en la producción de etanol son residuos industriales muy contaminantes para el medio ambiente. El calor de combustión del etanol aunque es ligeramente inferior al de la gasolina, sin embargo su octanaje (calidad del combustible) es superior.

1.2. El segundo biocombustible en importancia en la actualidad es el biodiesel, especialmente para los automóviles, debido a que su producción a gran escala está muy estudiada. El problema del biodiesel reside en que su producción microbiológica es muy cara, por ello, se suelen emplear cultivos oleaginosos pero como se ha visto a lo largo de este trabajo, esa no parece la forma más rentable para sustituir a los combustibles fósiles, ya que para el cultivo de estas plantas se necesitarían grandes superficies, por ello su producción a largo plazo se basará en encontrar métodos rentables de producción microbiológica de biodiesel, como por ejemplo emplear cepas modificadas de *Escherichia coli* o a partir de microalgas.

1.3. Es posible que en el futuro otros biocombustibles como el hidrógeno o el butanol sean los más empleados debido principalmente a sus características químicas. El hidrógeno presenta un alto calor de combustión y su síntesis deriva de microorganismos muy estudiados y fáciles de manipular, el principal problema deriva de que resulta muy difícil modificar un microorganismo para que presente una súper producción de hidrógeno ya que este no es un producto final de una ruta metabólica. El butanol, es uno de los compuestos derivados de la ruta fermentativa ABE llevada a cabo por multitud de microorganismos. El potencial del butanol deriva de sus características químicas que permiten su mezcla con la gasolina durante su transporte (lo que abarata el coste en infraestructuras). El problema que presenta es que es tóxico para las células, por lo que su futuro dependerá de construir cepas capaces de soportar grandes concentraciones de butanol en el medio de cultivo.

2. En relación al estudio realizado con las dos cepas de *Kluyveromyces lactis* podemos concluir que:

2. 1. En general el crecimiento, y por tanto la obtención de biomasa, en medios sintéticos de las dos cepas ensayadas es mucho mayor que en los medios complejos.

2.2. La producción de α y β -galactosidasa ha sido mayor también en los medios sintéticos que en los medios complejos. Sin embargo, si el objetivo es la producción de invertasa el medio complejo con melazas es el que produce mayores cantidades de actividad enzimática.

2.3. Tanto en el medio sintético con lactosa como en el lactosuero se han conseguido los mayores niveles de etanol, siendo este último medio el que ha generado la mayor cantidad de etanol para las dos cepas ensayadas.

2.4. La integración del gen *MEL1* en el genoma de la cepa GG799 no supone una ventaja en cuanto al crecimiento en los diferentes medios ensayados a excepción del medio con rafinosa que permite prácticamente duplicar los niveles de absorbancia obtenidos con respecto a la cepa silvestre.

2.5. Aunque la producción de β -galactosidasa es menor en todos los medios ensayados para la cepa mutante GG799*MEL1* comparada con la cepa silvestre, esta cepa mantiene niveles superiores de actividad invertasa que la cepa silvestre en todos los medios, además de poseer actividad α -galactosidasa.

2.6. En todos los medios ensayados, exceptuando el suero de leche, la cepa mutante GG799*MEL1* ha producido una mayor cantidad de etanol comparado con la cepa silvestre.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Shanab, R.A.I. ,Hwang, J. , Cho, Y. , Min, B. and Jeon, B. (2011). Charecterizacion of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potencial source for biodiesel production. *Applied Energy* 88, 3300-3306.
- Abou-Shanab, R.A.I., Ji, M. , Kim, H. , Paeng, K. and Jeon, B. (2013). Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production. *Journal of Enviromental Management* 115, 257-264.
- Amaro, H.M. ,Guedes, A.C. and Malcata, F.X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy* 88, 3402-3410.
- Atlas, M. and Bartha, R. 2002 *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Educación Madrid, España. 4ª ed.
- Bernfeld, P. (1951). Enzymes of starch degradation and synthesis. *Adv. Enzymol.*, 12: 379-427.
- Cheng, S. , Xing, D. , Call, D.F. and Logan, B.E. (2009). Direct Biological Conversion of Electrical Current into Methane by Electromethanogenesis. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3953-3958.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25 294-306.
- Clomburg, J. M and Gonzalez, R. (2010). Biofuel production in *Escherichia coli*: the role of metabolic engineering and synthetic biology. *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 419-434.
- Deng, B. , Yang, J. , Zhang, D. , Feng, R. , Fu, J. , Liu, J. , Li, K. and Liu, X. (2013). The challengues and strategies of butanol application in conventional engines: The sensitivity study of ignition and valve timing. *Applied Energy* 108, 248-260.
- Dubois, M., Giles, U.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956).Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356.
- Fajardo, E. E. and Sarmiento S. C. 2007 *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Sacharomyces cerevisiae**. Tesis doctoral. Pontificia Universidad Javeriana, Bogota.
- Gao, Z. ,Zhao, H. , Li, Z. , Tan, X. and Lu, X. (2012). Photosyntetic production of etanol from carbón dioxide in genetically engineered cyanobacteria. *Energy Environ. Sci.* 5, 9857- 9865.
- Guarente, L. (1983). Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods in Enzymology*, 101: 181-191.

- Knothe, G. 2005 Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. Fuel processing technology Vol. 86 Issue 10 Pag. 1059-1070.
- Kurmar, M. and Gayen, K. (2011). Developments in biobutanol production: New insights. Applied Energy 88, 1999-2012.
- Logan, B.E. ,Hamelers, B. , Rozendal, R. , Schröder, U. , Keller, J. , Freguia, S. , Aelterman, P. , Verstraete, W. and Rabaey, K. (2006). Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. Environmental Science & Technology, Vol. 40, No. 17.
- Ok Yu, K. , Jung, Y. , BazliRamzi, A. , HoonChoe, S. , Wook Kim, S. , Park, C. and Ok Han, S. (2013). Development of a *Saccharomyces cerevisiae* Strain for Increasing the Accumulation of Triacylglycerol as a Microbial Oil Feedstock for Biodiesel Production Using Glycerol as a Substrate. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 110, No.1.
- Pérez, O. and Villegas, A. El calor de combustión y el ahorro de energía, Cubasolar. <http://www.cubasolar.cu/biblioteca/energia/Energia20/HTML/articulo06.htm> 14/06/2013
- Rajchenberg-Ceceña, E. , Rodríguez-Ruíz, J.A. , Juárez López, K. ,Martinez Jiménez, A. and Morales Arrieta, S. (2009). Producción Microbiológica de Butanol. Biotecnología, Vol. 13 No.3.
- Richmond, M.L., Gray, J.I., Stine, C.M. (1981). Beta-galactosidase: review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization. J. Dairy Sci., 64 : 1759-1771.
- Ryan, M., Jones, R. and Morse, R. (1998).SWI-SNF complex participation in transcriptional activation at a step subsequent to activator binding. Molecular Cell Biology, 18 (4): 1774-1182
- Singh, R. (2013). Fermentative Biohydrogen Production Using Microbial Consortia.En Kumar Gupta, V. and Tuohy, M.T. (Eds), Biofuel Technologies (pp.273-299).Berlín: Springer.
- Strickland, J.D.H. and Parsons, T.R. (1968).A practical handbook of sea water analysis.J. Fish. Res. Board Canada, vol 167.
- Wageningen UR For quality of life Methane from CO2 with microbial electrolysis, <http://www.wageningenur.nl/en/show/Methane-from-CO2-with-microbial-electrolysis.htm> 14/06/2013
- Wikipedia, http://en.wikipedia.org/wiki/Heat_of_combustion última modificación 12/06/2013 consultada 14/06/2013

Zheng, Y. , Li, L. , Xian, M. , Ma, Y. , Yang, J. , Xu, X. and He, D. (2009). Problems with the microbial production of butanol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 1127- 1138.

ANEXO

Anexo_1

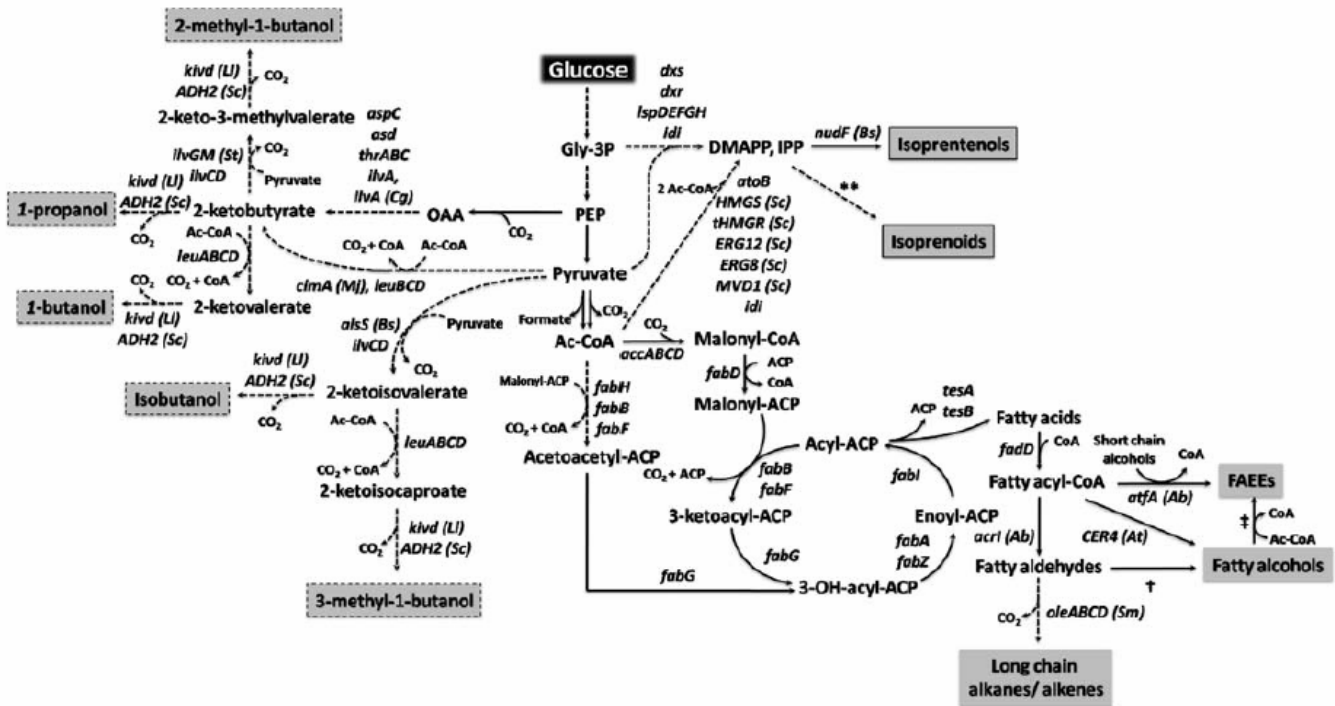


Ilustración 1: Ruta metabólica no fermentativa de *Escherichia coli*

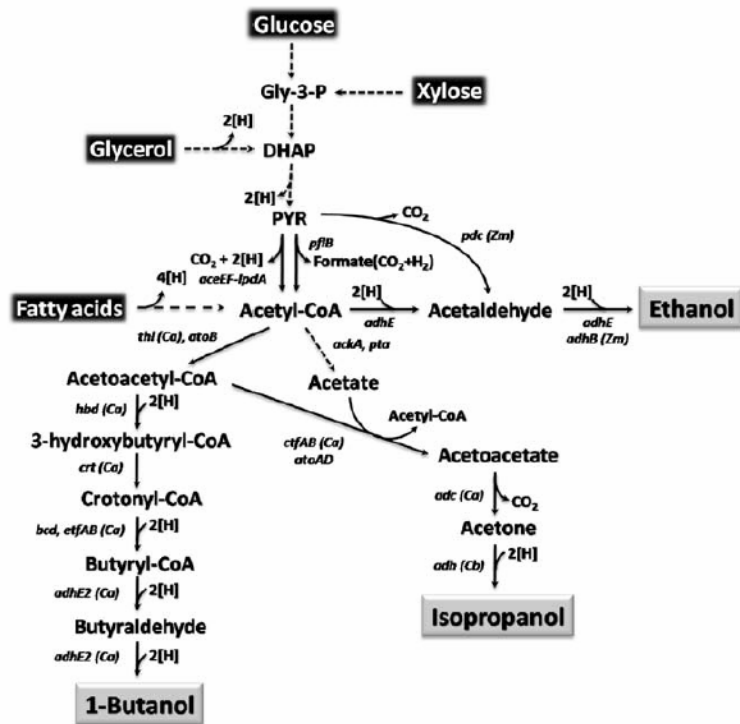


Ilustración 2: Ruta metabólica fermentativa de *Escherichia coli*

