

OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE CEPAS TERMOTOLERANTES EN PROCESOS DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

Teresa Fernández Aldama, Carlos Martín Medina,
Grupo de Tecnología de Biorrecursos, Departamento de Química e Ingeniería
Química, Universidad de Matanzas, Cuba.

Alfredo Martínez Jiménez,
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México,
Cuernavaca, Morelos, México.

Recibido:

Aceptado:

La integración de la hidrólisis enzimática y la fermentación en una etapa se conoce como proceso de Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SSF). Un serio inconveniente del proceso SSF usando *Saccharomyces cerevisiae* es que las temperaturas óptimas de las enzimas y de la levadura son diferentes. Por esta razón es necesario utilizar organismos con alta tolerancia térmica, lo que permitiría realizar la SSF a temperaturas más cercanas a las óptimas de las enzimas, con lo que mejoraría la conversión y, por ende, los rendimientos en etanol. Como se conoce que la cepa SuperStart, aislada de procesos de obtención de etanol a partir de maíz, posee alta tolerancia a inhibidores, para complementarla como organismo eficiente para la fermentación de hidrolizados celulósicos, es necesario incrementar su tolerancia térmica para que pueda ser usada en procesos de SSF. Se investigó entonces su adaptación por incubación a temperaturas de hasta 40 °C y se evaluó su comportamiento en procesos de SSF. Se realizaron experimentos de SSF paralelos a 30 °C y 38 °C, con las cepas progenitora y adaptada. En la SSF a 38 °C con la cepa adaptada se observó una mayor formación de etanol que en el experimento a 30 °C. La conversión de la celulosa fue superior en aproximadamente 4 % a la obtenida en la SSF a 30 °C.

Palabras clave: Bagazo de caña de azúcar, cepas termotolerantes, Etanol, fermentación simultáneas y sacarificación.

ISOLATION AND EVALUATION OF THERMOTOLERANT YEAST STRAINS IN SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION OF SUGARCANE BAGASSE

The integration of enzymatic hydrolysis and fermentation in one step is known as simultaneous saccharification and fermentation (SSF). A drawback associated with SSF

using *Saccharomyces cerevisiae* is the different optimum temperatures for saccharification and fermentation. The use of organisms with tolerance to high temperatures has to become a necessity. It enables to carry out the SSF at temperatures closed to optimum enzyme temperatures and leads to better conversion of the cellulose and high ethanol yields. As it is known SuperStart yeast, used for ethanol production from corn, has high tolerance to inhibitors. Increasing of thermotolerance is important in order to complete its efficiency for fermentation of cellulosic hydrolyzates to be used in SSF processes. Adaptation by incubation at temperatures up to 40 °C was investigated. Isolated yeast was evaluated in SSF processes. The experiments were carried out at 30 and 38 °C with adapted and non-adapted strains. A high ethanol formation was observed at 38 °C and cellulose conversion was higher in around 4%.

Key words: Ethanol, simultaneous saccharification and fermentation, sugarcane bagasse, thermotolerant yeasts.

INTRODUCCIÓN

El espectacular incremento del consumo de etanol durante el último lustro ha sido motivado por la necesidad de sustituir los combustibles derivados del petróleo, cuyos precios, a pesar del repliegue ocurrido durante los últimos meses, tienen una tendencia continua al alza. Debido al crecimiento de la demanda de energía en la transportación y al previsible repunte de los precios del petróleo, es lógico esperar que el incremento del consumo de etanol continúe en el futuro inmediato.

Para Cuba, un país con excelentes condiciones climáticas y larga experiencia en la agroindustria de la caña de azúcar, el etanol representa una gran oportunidad de crear empleos, mejorar la balanza comercial y disminuir la dependencia de fuentes externas de suministro de recursos energéticos, lo que tiene una gran importancia social, económica y estratégica.

Los materiales lignocelulósicos (MLC) representan materias primas abundantes y baratas con gran potencial para producir la mayor parte del etanol que demandará el mercado en un futuro próximo.^{7,27} Estos materiales contienen azúcares polimerizados en forma de celulosa y hemicelulosas, los que pueden ser liberados por hidrólisis y fermentados a etanol por microorganismos.⁷

En Cuba existen grandes cantidades de residuos lignocelulósicos, de los cuales el bagazo y la paja

de caña de azúcar se encuentran entre los más abundantes.

La celulosa y las hemicelulosas pueden ser hidrolizadas a azúcares simples, muchos de los cuales pueden ser fermentados a etanol por diferentes microorganismos. Sin embargo, producir azúcares con altos rendimientos y a bajo costo a partir de los MLC es más difícil que producirlos a partir de materiales azucarados o amiláceos. Por eso, a pesar de que el costo de la biomasa lignocelulósica es mucho más bajo que el de otras materias primas, el costo de obtener azúcares a partir de lignocelulosa ha sido históricamente demasiado alto como para atraer el interés por su uso industrial.²⁴ Por esta razón es necesaria la búsqueda de variantes tecnológicas económicamente sustentables.²⁶ La hidrólisis enzimática es un método selectivo, con un rendimiento cercano al 100 %. Además, el consumo de energía es bajo y durante este proceso no ocurre la formación de inhibidores.²³

Las principales limitaciones de la hidrólisis enzimática son el alto costo de las enzimas,²⁰ el requerimiento de grandes reactores debido a la lentitud de la reacción y la inhibición de la reacción por los azúcares liberados.^{10,12}

Para resolver las limitaciones de la hidrólisis enzimática se han desarrollado los procesos de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), los cuales integran la hidrólisis enzimática y la fermentación alcohólica en una etapa.^{15,16} Los azúcares liberados

por la hidrólisis son consumidos inmediatamente por los microorganismos presentes. Esto minimiza la inhibición de las enzimas por la celobiosa y la glucosa, lo que representa una gran ventaja sobre los procesos de sacarificación y fermentación por separado (SHF). La integración lograda en la SSF permite una mayor compactación de los procesos con la consecuente disminución de costos. Otras ventajas de la SSF son los rendimientos superiores de etanol, menores cantidades de enzimas y disminución del riesgo de contaminación.^{15,16,21,22}

Un serio inconveniente del proceso SSF usando *Saccharomyces cerevisiae* es que las temperaturas óptimas de las enzimas y de la levadura son diferentes, por lo que hay que usar una temperatura de compromiso, lo que resulta en una inferior actividad enzimática con una limitada conversión de la celulosa. Para disminuir el desbalance de temperaturas óptimas en este proceso es necesario utilizar organismos con alta tolerancia térmica, lo que permitiría realizar la SSF a temperaturas más cercanas a las óptimas de las enzimas, con lo que mejoraría la conversión.³

Existen diversos métodos de obtención de organismos termotolerantes, entre los que se encuentran la selección de cepas,⁵ fusión de protoplastos,¹⁸ mutagénesis,^{2,25} y adaptación a temperaturas crecientes.²²

Como se conoce que la cepa SuperStart, aislada de procesos de obtención de etanol a partir de maíz, posee alta tolerancia a inhibidores, para complementarla como organismo eficiente para la fermentación de hidrolizados celulósicos, es necesario incrementar su tolerancia térmica para que pueda ser usada en procesos de SSF. En este trabajo se

investigó entonces en el presente trabajo su adaptación por incubación a temperaturas de hasta 40 °C y se evaluó su comportamiento en procesos de SSF.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pretratamiento

El bagazo de caña de azúcar fue pretratado por prehidrólisis ácida en dos etapas utilizando H₂SO₄ al 4 % en una relación líquido sólido de 20:7. La duración de cada una de las etapas fue de 1 h y la temperatura en ambas fue de 121 °C.

Adaptación de la cepa SuperStart a temperaturas elevadas

La adaptación de la cepa tuvo lugar en un prehidrolizado obtenido por prehidrólisis ácida de bagazo de caña de azúcar a 12 °C durante 1 h. Inmediatamente antes de las fermentaciones, el prehidrolizado fue esterilizado por filtración y suplementado con extracto de levadura (10 g. L⁻¹), pep-tona (20 g. L⁻¹) y glucosa (20 g. L⁻¹). La adaptación se realizó en varias etapas (Fig. 1). Se partió de cultivos en medio sólido (YPD-agar) de la cepa industrial SuperStart. Inicialmente, una porción de cultivo fue transferida a un matraz Erlenmeyer de 125 mL que contenía 50 mL de prehidrolizado. El matraz con el medio fue incubado a 30 °C y 300 rpm durante 24 h. Posteriormente, 5 mL del cultivo obtenido fueron inoculados en 45 mL del prehidrolizado, y la mezcla fue incubada a 32 °C y 300 rpm durante 24 h. Al finalizar esta etapa se realizó una segunda inoculación en medio fresco a esa misma temperatura. Se repitió el procedimiento a 34, 36, 38 y 40 °C.

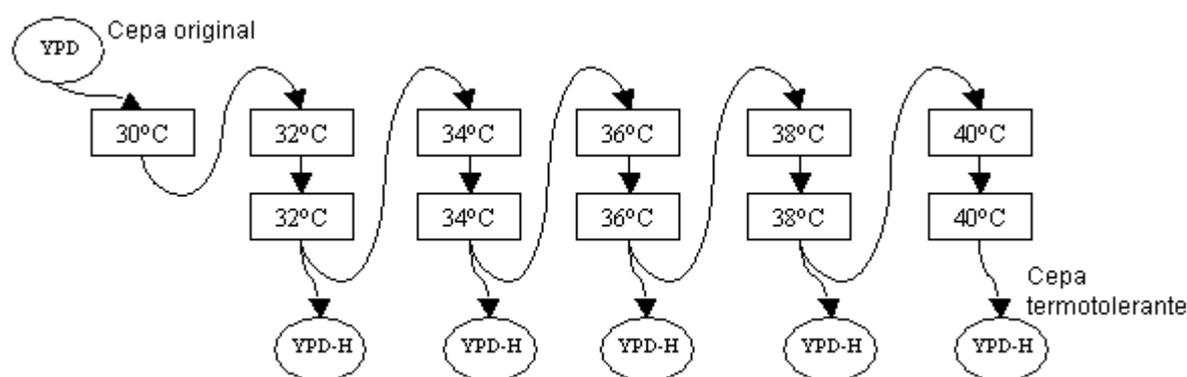


Figura 1. Esquema seguido para la adaptación de la cepa SuperStart a altas temperaturas

Los cultivos fueron seguidos por variación de la densidad óptica. Las concentraciones iniciales y finales de glucosa fueron determinadas utilizando un kit enzimático de glucosa oxidasa. Al final de la incubación a cada temperatura se hicieron diluciones de los cultivos y siembras en un medio sólido formado por YPD-agar suplementado con prehidrolizado de bagazo. Una de las colonias resultantes luego de la dilución 1000 X y siembra del cultivo obtenido a 40 °C fue resembrada en medio sólido, y fue utilizada posteriormente para preparar los cultivos con los que se inocularon los medios de SSF. Se realizaron dos réplicas de todos los experimentos.

Para el proceso de adaptación de la cepa nos basamos en experiencias previas de aislamiento de cepas termotolerantes de *S. cerevisiae*⁶ y de adaptación de una cepa a inhibidores de la fermentación,¹³ así como en reportes de la literatura sobre selección de cepas termotolerantes.³

Para verificar la capacidad de la cepa adaptada para fermentar medios lignocelulósicos a temperaturas elevadas, se realizaron fermentaciones de prehidrolizados ácidos de bagazo a 38 °C con la cepa adaptada y la cepa progenitora. Los prehidrolizados fueron suplementados con 25 g. L⁻¹ de glucosa para suplir la deficiencia de ese azúcar. Además, fueron enriquecidos con extracto de levadura (2.5 g. L⁻¹) y peptona (5 g.L⁻¹), y el pH se ajustó a 5.0.

Microorganismo

La levadura fue propagada en un prehidrolizado ácido enriquecido con los componentes del medio YPD. El medio fue incubado a 30 °C y 300 rpm durante 16 h. El crecimiento fue monitoreado por la variación de la densidad óptica. El cultivo obtenido fue centrifugado a 4 500 rpm y 4°C durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en agua estéril en una proporción adecuada para que al ser añadido 1 mL de la suspensión al medio de SSF resultara una concentración de células de 1 g.L⁻¹.

SSF con la cepa adaptada

El bagazo pretratado fue mezclado con una solución de tampón de citratos (pH 5,0) dando la

concentración de sólidos requerida para el experimento (8 %). Se utilizó la preparación enzimática GC 220 (Genencor, EE.UU.) a una carga de 25 FPU por gramo de bagazo. El medio fue enriquecido con extracto de levadura (2,5 g. L⁻¹) y peptona (5 g. L⁻¹). Se inoculó el cultivo de levaduras previamente elaborado, y la mezcla de reacción se incubó a 30 °C y a 38 °C y 150 rpm durante 120 h. Se realizaron dos réplicas de todos los experimentos.

Análisis

La glucosa se determinó con un analizador YSI (Yellow Springs, EE.UU.) basado en la oxidación con glucosa oxidasa. El etanol fue determinado por cromatografía de gases (GC-6850, Agilent, EE.UU.) utilizando un detector de ionización de llama. Se utilizó helio como gas portador y butanol como estándar interno.

Cálculos

Para calcular la convertibilidad enzimática de la celulosa (%) se calculó la masa de glucosa multiplicando su concentración por el volumen del hidrolizado. Posteriormente, se dividió la masa del azúcar por la masa seca de la muestra de bagazo de la cual fue obtenido el hidrolizado y se multiplicó por 100. El rendimiento de etanol a partir de glucosa (g. g⁻¹) fue calculado como la cantidad de etanol formada (g) dividida por la cantidad inicial de glucosa (g). La productividad volumétrica máxima (g. L⁻¹ h⁻¹) se basó en la cantidad de etanol producida por litro de medio por hora durante las primeras 6-8 horas de fermentación. El procesamiento estadístico se realizó utilizando herramientas de *STATGRAPHICS PLUS 5.0*.

RESULTADOS

La cepa SuperStart sobrevivió el proceso de adaptación hasta los 40 °C. Porciones de los cultivos de esa cepa a 36 °C, 38 °C y 40 °C fueron diluidas y sembradas en medio sólido donde tuvieron buen crecimiento. Según algunos investigadores,^{5,11} las levaduras termotolerantes son aquellas capaces de crecer a temperaturas superiores a 40 °C. En otros reportes se consideran termotolerantes a las levaduras con crecimiento en el rango de 33-35 °C,¹⁴ mientras que las capaces de crecer a temperaturas supe-

riores a 48 °C se consideran termófilas.⁴ Teniendo en cuenta los criterios anteriores, la cepa adaptada en este trabajo, la cual fue capaz de crecer a 38-40 °C, puede ser considerada como termotolerante.

El aumento de la tolerancia a altas temperaturas está relacionado con la inducción de la síntesis de un grupo

de proteínas conocidas como “*heat shock proteins*”, las cuales incrementan la resistencia al estrés térmico.⁹ Algunos autores también plantean la posibilidad de que durante el proceso de adaptación a las temperaturas elevadas se generen otros factores de resistencia que favorezcan el comportamiento fermentativo ulterior de las cepas adaptadas.^{1,3}

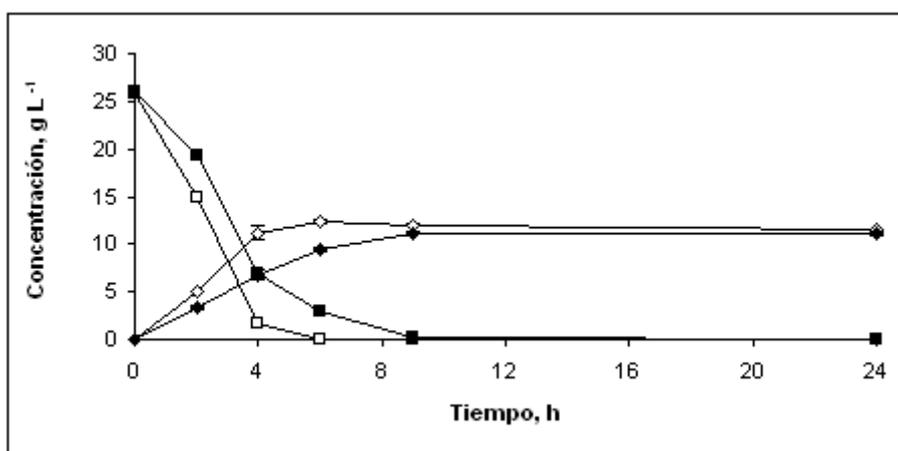


Figura 2. Consumo de glucosa (cuadrados) y formación de etanol (rombos) durante la fermentación de prehidrolizados ácidos de bagazo a 38 °C con la cepa SuperStart no adaptada (símbolos rellenos) y con la cepa SuperStart termotolerante (símbolos vacíos).

En la fermentación con la cepa adaptada se observó un rápido consumo de glucosa, y la producción de etanol fue más rápida que con la cepa progenitora (Figura 2). Con la cepa adaptada, desde las 4 h de fermentación se alcanzaron concentraciones de etanol superiores a 11 g.L⁻¹, mientras que con la cepa no adaptada se requirieron 9 h para alcanzar esos valores. La productividad volumétrica de etanol con la cepa adaptada fue aproximadamente en un 40 % superior a la alcanzada con la cepa no adaptada (Tabla 1).

Se comprobó que las diferencias de los resultados experimentales fueron estadísticamente significativas para un valor de probabilidad de 0,05. Estos resultados indican que el proceso de

adaptación fue efectivo y que se logró mejorar la tolerancia de la cepa SuperStart a temperaturas elevadas.

Para confirmar el efecto de la temperatura sobre la conversión de la celulosa en los procesos SSF de bagazo pretratado por prehidrólisis ácida se realizaron experimentos paralelos a 30 °C y 38 °C, con las dos cepas. La concentración de sólidos en el experimento fue de 8 %, y la cantidad de levadura inoculada correspondió a 1 g de biomasa celular por litro de medio.

En la SSF a 38 °C con la cepa adaptada se observó una mayor formación de etanol que en el experimento a 30 °C (Figura 3).

Tabla 1. Rendimiento y productividad volumétrica de etanol obtenidos en la evaluación de la termotolerancia de la cepa adaptada en fermentación a 38 °C.

Cepa	Rendimiento de etanol, (g g ⁻¹)	Productividad volumétrica de etanol (g. L. ⁻¹ h ⁻¹)
Adaptada	0,46	2,80
No adaptada	0,42	1,67

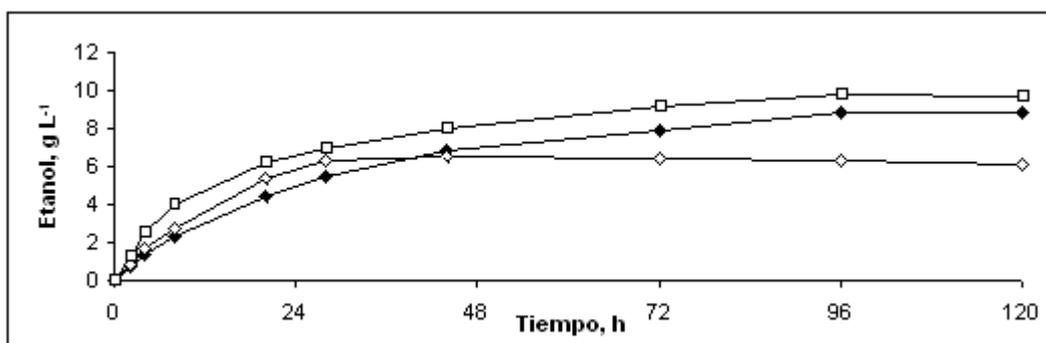


Figura 3. Formación de etanol durante la SSF de bagazo a 30 °C (símbolos rellenos) y a 38 °C (símbolos vacíos) con la cepa adaptada (cuadrados) y la cepa no adaptada (rombos)

La conversión de la celulosa fue superior en aproximadamente 4 % a la obtenida en la SSF a 30 °C (Tabla 2).

Por otra parte, en el experimento a 38 °C con la cepa no adaptada durante las primeras 24 h la

fermentación siguió un comportamiento similar al observado en la fermentación separada (Figura 3), pero a continuación la formación de etanol se hizo más lenta y luego cesó completamente como consecuencia de la inactivación térmica de la levadura.

Tabla 2. Concentración de etanol y conversión de celulosa durante la SSF de bagazo a 30 °C y a 38 °C con la cepa adaptada

Temperatura, °C	Concentración de etanol, g. L ⁻¹	Conversión de celulosa, %
30	8,8	37,1
38	9,8	41,3

La mayor formación de etanol en la SSF a 38 °C con la cepa adaptada se debió a que esa temperatura, al ser más cercana a la óptima de las celulasas, es más favorable para la hidrólisis enzimática de la celulosa.⁸ Además, como la cepa adaptada tolera bien esa temperatura, el desbalance entre las temperaturas óptimas de la enzima y de la levadura es menor que cuando la SSF se realiza a 30 °C ó 32 °C.^{15,18,19} Estos resultados concuerdan con los obtenidos con otras cepas termotolerantes en SSF de distintas fuentes de biomasa lignocelulósica presentados en una revisión reciente, en la que se compendian resultados de experimentos de SSF de varios materiales a temperaturas entre 37 °C y 43 °C.¹⁶

CONCLUSIONES

Se logró adaptar la cepa SuperStart a condiciones de estrés térmico y se verificó su capacidad para fermentar medios lignocelulósicos a temperaturas elevadas en procesos SSF.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero del TWAS-UNESCO associateship Scheme at centres of Excellence in the South. También se agradece el apoyo del Conacyt a través de los Proyectos Sagarpa 2004-C01-224 y Fomix Estado de Morelos MOR-2004-C02-048, de los Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica - UNAM proyecto IN220908 y del Proyecto 510104 de la Delegación Territorial del CITMA en Matanzas.

BIBLIOGRAFÍA

1. ABDEL-FATTAH, W.; M. FADEL; I. BANET: Isolation of thermotolerant ethanologenic yeast and use of selected strains in industrial scale fermentation in an Egyptian distillery," *Biotechnol. Bioeng.* (68): 531-532.
2. ÁLVAREZ, X. Y OTROS: Influencia de la temperatura

- y concentración celular en mutante auxótrofo de *S. cerevisiae*, *Memorias del IV Taller Internacional de Producción de Alcohol y Levaduras* (TIPAL). Varadero, Cuba, 2003. ISBN: 959-16-0227-8.
3. ARAQUE, E. ET AL.: "Selection of thermotolerant yeast strains *S. cerevisiae* for bioethanol production," *Enzyme Microb. Tech.* (43): 120-123, 2008.
 4. BANAT, I. M. ET AL.: "Ethanol production at elevated temperatures and ethanol concentrations: Part I - Yeasts in general," *World J. Microbiol. Biotechnol.* (14): 809-821, 1998.
 5. D'AMORE, T.; C.J. PANCHAL; I. RUSSELL AND G.G. STEWART: "A study of ethanol tolerance in yeast" *Critical Reviews in Biotechnology* (9): 287-304, 1989.
 6. FERNÁNDEZ, T.; M. MARCET; W. OLIVERA; C. MARTÍN: "Aislamiento y evaluación de cepas termotolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de aguardientes y ronés," *Ciencia y Tecnología Alimentarias* (6): 64-70, 2008.
 7. GRAY, K. A.; L. ZHAO; M. Emptage: Bioethanol, *Current Opinion in Chemical Biology* (10): 141-146, 2006.
 8. GROHMANN, K.: Simultaneous saccharification and fermentation of cellulosic substrates to ethanol, en *Bioconversion of forest and agricultural residues* (Saddler, J.N., ed.). CAB International, Wallingford, pp. 183-210, 1993.
 9. HIRAISHI, H.; M. MOCHIZUKI AND H. TAKAGI: "Enhancement of stress tolerance in *S. cerevisiae* by overexpression of ubiquitin ligase Rsp5 and ubiquitin-conjugating enzyme," *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 2762-2765, 2006.
 10. KÁDÁR, Z.; Z. SZENGYEL AND K. RÉCZEY: Simultaneous saccharification and fermentation of industrial wastes for the production of ethanol," *Ind. Crop. Prod.* (20): 103-110.
 11. LEE, C.; T. YAMAKAWA AND T. KODAMA: "Rapid growth of a thermotolerant yeast on palm oil," *World J. Microbiol. Biotechnol.* (9): 187-190, 1993.
 12. LINDE, M.; M. GALBE; G. ZACCHI: "Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration," *Enzyme Microb. Technol.* (40): 1100-1107, 2007.
 13. MARTÍN, C.; O. ALMAZÁN; M. MARCET AND L.J. JÖNSSON: "A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production," *Int. Sugar J.* (109): 33-39, 2007.
 14. MORIMURA, S.; Z.L. LING AND K. KIDA: Ethanol production by repeated-batch fermentation at high temperature in a molasses medium containing a high concentration of total sugar by a thermotolerant flocculating yeast with improved salt tolerance," *J. Ferm. Bioeng.* (83): 271-274, 1997.
 15. OLOFSSON, K.; A. RUDOLF; G. LIDÉN: "Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Biotechnol.* (134): 112-120, 2008a.
 16. _____: "A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks," *Biotechnology for Biofuels* (1): 1, 2008b.
 17. RUDOLF, A.; M. ALKASRAWI; G. ZACCHI AND G. LIDÉN: "A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce," *Enzyme Microb. Technol.* (37): 195-205, 2005.
 18. SAKANAKA, K.; W. YAN; M. KISHIDA AND T. SAKAI: "Breeding a fermentative yeast at high temperature using protoplast fusion," *J. Ferm. Bioeng.* (81): 104-108, 1996.
 19. SASSNER, P.; M. GALBE AND G. ZACCHI: "Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam pre-

- treated Salix at high dry-matter content,” *Enzyme Microb Technol.* 39(4): 756-762, 2006.
20. Sheehan, J.S. and M.E. Himmel: “OUTLOOK FOR bioethanol production from lignocellulosic feedstocks: Technology hurdles, *Agro Food Ind. Hi-Tech.* 12: 54-57, 2001.
 21. SUN, Y. AND J. CHENG: “Hydrolysis of the lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresource Technol.* 83(1): 1-11, 2002.
 22. SUUTARI, K.; K. LIUKKONEN AND S. LAAKSO: “Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids,” *J. Gen. Microbiol.* (136): 1469-1474, 1990.
 23. TAHERZADEH, M.J.; AND K. KARIMI: “Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review,” *Bio Resources* (2): 707-738, 2007.
 24. TENGBORG, C.; M. GALBE AND G. ZACCHI: “Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam pretreated softwood,” *Biotechnol. Prog.*, 17, 110-117, 2001.
 25. WATI, L. ET AL.: “Characterization of genetic control of thermotolerance in mutants of *Saccharomyces cerevisiae*”, *The Genetic Engineer and Biotechnologist*, 16, 19-26, 1996.
 26. WYMAN, C.: “What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol,” *Trends Biotechnol.*, 25, 153-157, 2007.
 27. _____: “Cellulosic ethanol: a unique sustainable liquid transportation fuel,” *MRS Bulletin*, 33, 381-383, 2008.