

Biocombustibles: la nueva alquimia

***Thermoanaerobacterium saccharolyticum* ALK2**

Frank Carlos Vargas Tangua*

* Biólogo y Especialista en Química Ambiental. U.I.S. Docente Investigador de UNISANGIL en Microbiología Ambiental. Docente de Biología, Ecología y Bioquímica.
fvargas@unisangil.edu.co

Palabras clave: biomasa celulósica, celulosa, bioprocesamiento consolidado, ALK2, CEM, bacterias termo-anaerobias

Resumen

El desarrollo por procesos de biotecnología de la bacteria anaerobia *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* ALK2, constituye una alternativa para la utilización de biomasa celulolítica para la producción de etanol por bioprocesamiento consolidado. El entendimiento de las características estructurales, metabólicas y fisiológicas de los microorganismos con potencial celulolítico aceleró la experimentación con variadas especies bacterianas o con sus cepas modificadas genéticamente, hasta acercarse estrechamente al desarrollo de un proceso que permitió la utilización de celulosa para la producción de etanol en condiciones especiales, que pueden ser ahora escaladas a procesos industriales. Estamos frente al nacimiento de una nueva era de la generación de combustibles limpios.

Abstract

The development of biotechnology processes, of the anaerobic bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* ALK2, is an alternative to the use of Cellulolytic biomass for ethanol production by consolidated bioprocessing. Understanding the structural, metabolic and physiological potential of microorganisms Cellulolytic, accelerated experimentation with different bacterial species or strains genetically modified to its close approach to the development of a process that allowed the use of cellulose for ethanol production under special conditions that can now be scaled to industrial processes, we compared the birth of a new generation of clean fuels.

I. INTRODUCCIÓN

Este artículo es un esfuerzo por informar en un contexto científico los avances obtenidos en la última década en el desarrollo de nuevas alternativas en la utilización de substratos para la producción industrial de etanol. Por esto, comienza resaltando la eficiencia del proceso fotosintético en la generación natural de biomasa celulósica; seguidamente se describen los adelantos en la ingeniería bioquímica y metabólica que permitieron vislumbrar el camino microbiológico, específicamente en el desarrollo y ensayo de nuevas cepas microbianas que fueron dando luces en torno de la metodología de trabajo experimental que finalmente resultó en la generación de ALK2 y que abre las puertas de una nueva era de los biocombustibles, al tiempo que plantea expectativas en campos como la ingeniería genética microbiana y la fisiología vegetal y fitoquímica. El texto agrega también un elemento de innovación que tiene cabida en el análisis de temas como la seguridad alimentaria.

II. SUBSTRATOS FOTOLUMÍNICOS

La cantidad de energía solar almacenada en forma de carbono orgánico por el proceso de fotosíntesis, es 10 veces más que la energía utilizada en el mundo. La lignocelulosa es el recurso natural renovable más económico, abundante y disponible para la producción de combustibles. Las plantas terrestres lo producen en una cantidad aproximada de 1.3×10^3 toneladas métricas de carbón peso seco base de madera por año, lo cual equivale a 7×10^9 toneladas métricas de carbón, equivalente a su vez, a las $2/3$ partes de los requerimientos mundiales de energía [1].

La materia prima celulósica disponible proveniente de las actividades agrícolas y de otras fuentes naturales es del orden de los 180 millones de toneladas por año [2]. De otra parte, grandes cantidades de celulosa están disponibles como residuos municipales o industriales que hoy se constituyen en contaminantes ambientales que generan problemas tan globales como el efecto invernadero.

La celulosa es el componente más abundante de la biomasa de las plantas y de los residuos vegetales de especies agrícolas [3]; se encuentra en la naturaleza casi exclusivamente en las paredes celulares vegetales.

En este grupo de materias primas se ubica el bagazo como residuo agroindustrial; la idea de producir etanol a partir de este substrato data de las décadas de 1940 y 1950, y su producción se ha llevado a escala comercial en algunos países, principalmente del mundo desarrollado [4]. Sin embargo, el impedimento técnico central para que la biomasa celulósica pueda ser utilizada ampliamente había sido, hasta ahora, la inexistencia de una tecnología de bajo costo y altamente efectiva para aprovechar su potencialidad como substrato para la producción de etanol [5].

Además, se requería de una estrategia promisorio que permitiera la transformación de estas moléculas complejas en azúcares fermentables y etanol, sin formación de compuestos químicos peligrosos como residuo, y que utilizara microorganismos celulolíticos o consorcios, altamente eficientes [6].

III. MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS

En respuesta a esta necesidad, para el año 2002 se establecieron los fundamentos biotecnológicos de su uso [7]; los estudios se concentraron en obtener avances en el conocimiento de su estructura, composición, determinación de los sistemas de enzima celulasa, la elucidación de los sistemas enzimáticos complejos y no complejos, su biología molecular y la fisiología de los microorganismos celulolíticos, entre otros.

Se ensayaron diferentes alternativas; una de ellas, usando *Clostridium thermohydrosulfuricum* [8]; se estudiaron las bases bioquímicas de su tolerancia a las concentraciones de etanol y de hidrógeno. Esta investigación en particular resultó fundamental ya que se utilizaba una bacteria termofílica anaerobia para la transformación de substratos lignocelulósicos; sin embargo, no hubo éxito en la producción de etanol en volúmenes interesantes industrialmente, por inhibición de la bacteria por el producto, probablemente debido a la combinación del efecto solvente que afecta a la membrana y a la inhibición específica de las enzimas que transforman la glucosa fosfato.

Es necesario anotar que entre las bacterias útiles en la conversión de substratos lignocelulósicos están las bacterias aerobias y las anaerobias, para las cuales se reporta un mecanismo de sinergia entre las enzimas (Exogluconasas, Endoglucanasas y Celobiohidrolasas) que conforman los diferenciales sistemas enzimáticos que las caracterizan y que rompen los enlaces que mantienen unida la estructura del polisacárido.

Durante algunos años, las investigaciones estuvieron centradas en las bacterias aerobias que poseen sistemas enzimáticos no complejos [9, 10] con generación de celobiosa, como el principal producto de la hidrólisis de la celulosa; sin embargo, la eficiencia en la conversión de los substratos a etanol no fue tan alta como se esperaba, en razón de su incapacidad para utilizar los productos de la hidrólisis [11].

La biohidrólisis de la celulosa representa el mayor flujo de carbono en la biosfera [12], y puede ser mediada por el complejo ternario celulosa-enzima-microbio (CEM), más que por un complejo binario celulosa-enzima (CE), que es común en las bacterias aerobias.

Para las bacterias celulolíticas anaerobias como *Clostridium thermocellum*, el complejo CEM es el mayor agente de hidrólisis [13]. Además, *C.thermocellum* exhibe la formación

de un complejo enzimático especial llamado celulosoma [14], el cual le proporciona la capacidad de asimilar celodextrinas con un significativo grado de polimerización mientras crece sobre la celulosa, generando rendimientos de etanol importantes. En tal sentido, *C. thermocellum* se constituyó en el punto de partida para el desarrollo de microorganismos anaeróbicos capaces de procesar en un sólo paso biomasa celulósica a etanol en ausencia de enzimas sacarolíticas adicionales [15].

IV. ETANOL OXIGENANTE

Los adelantos científicos alcanzados en más de una década rindieron sus frutos, y la utilización de la celulosa como substrato empezó a perfilarse seriamente como una alternativa viable técnicamente y que podría ofrecer grandes beneficios en términos de sostenibilidad, seguridad y desarrollo económico y rural [16].

Para la industria de los biocombustibles, el etanol es un alcohol carburante que debe ser utilizado como oxigenante de la gasolina, elevando su contenido de oxígeno, lo que permite una mayor combustión de la misma disminuyendo las emisiones contaminantes de hidrocarburos no oxidados completamente, con otras ventajas adicionales como por ejemplo mayor octanaje, no es tóxico, reduce las emisiones de CO y no contamina las fuentes de agua como lo hacen sus antecesores ETBE, MTBE; pero su producción seguía siendo más costosa [17].

El microorganismo más utilizado para la producción de etanol ha sido la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, sobre la cual se trabaja genéticamente; convierte las hexosas en etanol en condiciones anaeróbicas, generando dos moles de ATP por cada mol de hexosa consumida, más dos moles de etanol.

Este microorganismo también tiene la ventaja adicional de tolerar concentraciones relativamente altas de etanol hasta de 150 g. L⁻¹ [18]. Sin embargo, su rendimiento en la transformación de celulosa en etanol experimentaba dificultades técnicas por inhibición y altos costos en los sistemas de enfriamiento, ya que sus enzimas sufren cambios estructurales por encima de los 37°C.

V. ALK2, PERTURBANDO EL EQUILIBRIO

Como si se tratase de generar el máximo nivel de entropía posible, en julio 22 de 2008, los científicos del Thayer School of Engineering and Department of Biological Sciences, Dartmouth College, publicaron en la revista PNAS de los Estados Unidos los resultados de su investigación sobre la bacteria denominada *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* ALK2. Esta bacteria es un producto de la ingeniería metabólica y una oportunidad para el desarrollo de los biocombustibles, al tiempo que constituye una verdadera posibilidad de

darle utilidad a los residuos celulolíticos, incrementando la eficiencia en la producción de etanol por hectárea de cultivos energéticos cultivados y procesados.

Thermoanaerobacterium saccharolyticum ALK2 es una bacteria anaerobia que fermenta Xilano y los azúcares derivados de la biomasa celulósica y produce etanol con alta eficiencia, como único producto orgánico detectable. Coutiliza glucosa y xilosa y la utilización de manosa y arabinosa comienza antes de que se agoten la glucosa y la xilosa, igual sucede para la galactosa.

Trabaja a 50°C haciendo a su complejo enzimático altamente eficiente; no es inhibida por productos intermediarios del metabolismo porque simplemente no los produce, ya que los genes que codifican las enzimas para las vías metabólicas que los generan fueron eliminados por ingeniería genética y en la hidrólisis y fermentación simultánea en cultivos continuos disminuye 2,5 veces la carga de celulasa necesaria, disminuyendo ostensiblemente los costos de producción de etanol. Además, su eficiencia es estable por más de 150 generaciones en cultivo continuo.

Los rendimientos de la formación de etanol por *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* ALK2, son del orden de 33,1 g/L de etanol, frente a 8,7 g/L de *Saccharomyces cerevisiae* [19] en un solo paso, reduciendo los tiempos de generación y los efectos ambientales negativos. Eventualmente, cualquier substrato que contenga celulosa es útil como fuente de azúcares reductores para producir etanol.

VI. EL FUTURO INMEDIATO

Con estas condiciones, ya se habla de un cambio en los Estados Unidos de substratos hasta ahora utilizados para la producción de alcohol carburante como el maíz por biomasa celulósica, y de alguna manera se constituye en un alivio a la presión sobre los cultivos de uso alimentario humano.

El incremento de la eficiencia de esta cepa de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* ALK2 en la producción de etanol, se considera un reto que posiblemente se logre por bioingeniería metabólica. Habrá que vencer la barrera de los pretratamientos para incrementar la eficiencia en la oxidación de la celulosa a azúcares fermentables, para lo cual, el descubrimiento de nuevos microorganismos quizá sea la clave [21]; además de que se inicia un tiempo en el que la búsqueda de especies vegetales no útiles en la alimentación humana y con altos contenidos de material celulósico, reemplacen o constituyan la base de la producción de etanol celulósico. Casi de inmediato veremos el inicio de la construcción de plantas de etanol celulósico que reemplace a las actuales.

REFERENCIAS

- [1] A. L. Demain, M. Newcomb. J. H. D. Wu. *Cellulas, Clostridia and Ethanol*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 69(1), p. 124-154, marzo, 2005.
- [2] L. R. Lynd, H. Jin, J. G. Michels, C. E. Wyman. B. Dale. *Posting date. Bioenergy: background, potential, and policy* Disponible en: http://agriculture.senate.gov/Hearings/hearings.cfm?hearingid_1161&witnessId_3320.
- [3] M. T. Hernández. *Tendencias actuales en la producción de Bioetanol* (en línea). Disponible en: http://www.tec.url.edu.gt/boletin/URL_08_ING01.pdf
- [4] H. Bernard, *Energy for renewable resources*. En M. T. Hernández. Disponible en: http://www.tec.url.edu.gt/boletin/URL_08_ING01.pdf
- [5] L. R. Lynd, R. T. Elander y C. E. Wyman. *Likely features and costs of mature biomass ethanol technology*. Applied Biochemistry Biotechnology, vol. 57-58 (1), p. 741-761, Marzo, 1996.
- [6] Lynd y Wyman. En M. T. Hernández, *Tendencias actuales en la producción de Bioetanol*. Disponible en: http://www.tec.url.edu.gt/boletin/URL_08_ING01.pdf
- [7] L. R. Lynd, W. H. van Zyl, J. E. McBride, M. Laser. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: An update. *Curr Opin Biotechnol*, vol. 16, p. 577-583, octubre, 2005.
- [8] R. W. Lovitt, V. G. Shen y J. G. Zeikus. Ethanol Production by Thermophilic Bacteria: Biochemical Basis for Ethanol and Hydrogen Tolerance in *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Journal of Bacteriology*, vol. 170(6), p. 2809-2815, junio, 1988.
- [9] C. Divne, J. Stahlberg, T. Reinikainen, L. Ruohonen, G. Pettersson, J. K. Knowles, T. Teeri. T. A. Jones. Three-dimensional structures of three engineered cellulose-binding domains of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Protein Science*, vol. 6(2), p. 294-303, 1997.
- [10] H. P. Zhang. L. R. Lynd. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 88, p. 797-824, 2004.
- [11] L. R. Lynd, P. J. Weimer, W. H. van Zyl y I. S. Pretorius. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Review*, vol. 66(3), p. 506-577, 2002.
- [12] R. A. Berner. The long-term carbon cycle, fossil fuels and atmospheric composition. *Nature*, vol. 426, p. 323-326, 2003.

- [13] L. R. Lynd, P. J. Weimer, W. H. van Zyl y I. S. Pretorius. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Review*, vol. 66(3), p. 506–577, 2002.
- [14] F. Mayer, M. P. Coughlan, Y. Mori. L. G. Ljungdahl. Macromolecular organization of the cellulolytic enzyme complex of *Clostridium thermocellum* as revealed by electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 53, p. 2785–2792, 1987.
- [15] A. L. Demain, M. Newcomb. J. H. D. Wu. *Cellulas, Clostridia and Ethanol*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 69(1), pp. 124-154, 2005.
- [16] Y. Lu, Yi-Heng Percival Zhang, and Lee R. Lynd. Enzyme–microbe synergy during cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103(44), pp. 16165-16169, octubre, 2006.
- [17] F. Nadim, P. Zack, G., Hoag y S. Liu. United States experience with gasoline additives. En O. J. Sánchez y C. A. Cardona. Producción biotecnológica de alcohol carburante: obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, vol. 30 (11), pp. 671-678, noviembre, 2005.
- [18] P. A. M. Claassen, J. B. van Lier, A. M. López, E. W. J. van Niel, L. Sijtsma, A. J. M. Stams, S. S. de Vries, R. A. Weusthuis *et al.* Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. En O. J. Sánchez y C. A. Cardona. Producción biotecnológica de alcohol carburante: obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, vol. 30 (11), pp. 671-678, noviembre, 2005.
- [19] A. J. Shaw, K. K. Podkaminer, S. G. Desai, J. S. Bardsley, S. R. Rogers, P. G. Thorne, D. A. Hogsett. L. R. Lynd. Metabolic engineering of a thermophilic bacterium to produce ethanol at high yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105(37), pp. 13769-13774, 2008.