



INGENIERÍA DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A TEMPERATURA ELEVADA CON *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Arturo I. Montes de Oca¹, Eduardo Abarca¹, Jesús Coronel¹, Lidia Gonzales¹, Alfredo Martínez², Luis Caspeta^{2#}.
¹ Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001. Col Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62209, México, ² Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001. Col Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, México. #lucaspeta@ibt.unam.mx.

Palabras clave: Evolución adaptativa en laboratorio (EAL), alta temperatura, toxicidad por etanol.

Introducción. El calentamiento global se relaciona con la quema de combustibles fósiles, los cuales se agotarán en algún momento (1). Por lo tanto, es importante reemplazar estos combustibles por otras fuentes que generen menos emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) y sean sostenibles. Una opción es el bioetanol lignocelulósico, el cual puede reducir hasta en un 90% las emisiones de GEI (2). Para que esto ocurra se debe minimizar el uso de energía en la fermentación. Esto se puede lograr disminuyendo la velocidad de agitación, el flujo de agua de enfriamiento y la aireación (1, 2). Esto disminuye la transferencia de masa y calor e incrementa la temperatura y la presión osmótica en las fermentaciones. Aunque lo anterior ocasiona daño térmico y alta presión osmótica aunado a toxicidad por etanol en *Saccharomyces cerevisiae*, no obstante, reduce los riesgos de contaminación y la energía requerida para la destilación. Además, temperaturas elevadas mejoran la hidrólisis enzimática de la celulosa y permiten la sacarificación y fermentación simultáneas, lo que reduce los costos de operación (3). Sin embargo, se requieren de cepas de *S. cerevisiae* que pueden operar a temperaturas elevadas (>40 °C). La evolución adaptativa en laboratorio (EAL) y el análisis transcriptómico se han utilizado para generar termotolerancia y aumentar la síntesis de etanol (4).

En este estudio utilizamos EAL y análisis transcriptómico para diseñar fermentaciones a altas temperaturas para producir etanol en condiciones industriales.

Metodología. Para la EAL se utilizó la técnica de cultivo secuencial en matraces, la cual consiste en realizar diluciones diarias de poblaciones de levadura, en medio de cultivo fresco a 39.5 °C, comenzando siempre en 0.2 de densidad óptica a 600 nm (4). El análisis transcriptómico se realizó por Microarreglos de la cepa termo-tolerante 23 y su cepa parental (S288C), ambas cultivadas en medio mínimo a 30°C.

Resultados. La cepa de levadura termotolerante TT23 se aisló de la EAL después de 1200 generaciones. Esta no presenta duplicaciones cromosomales – es estable para el proceso. El análisis transcriptómico de TT23 sugirió lo siguiente. El aumento de la glucólisis y fermentación etanólica, pues aumentó la transcripción de los genes para los pasos de liberación de energía en la glucólisis y la oxidación del poder reductor (NADH) a través de la síntesis de etanol; la reducción transcripcional de los transportadores mitocondriales de piruvato (MPC1 y MPC3) y elementos de cadena de transporte de electrones; así como el aumento de la expresión de PMA1, responsable del exporte de protones. Aunque el proceso evolutivo mejoró la resistencia a temperatura e incremento la biosíntesis de etanol, el incremento de la expresión de PAM1 resultó en una menor resistencia a elevadas concentraciones

de etanol (5) (Fig. 1). Esta baja tolerancia al etanol – mal adaptación – se pudo revertir aumentando el pH inicial del medio. En fermentaciones con 150 g/L de glucosa a 40°C, la TT23 produce 25% más etanol que la cepa parental. Ni la cepa parental ni la termotolerante fermentan 100 g/L de glucosa a 42 °C a pH inicial de 5.

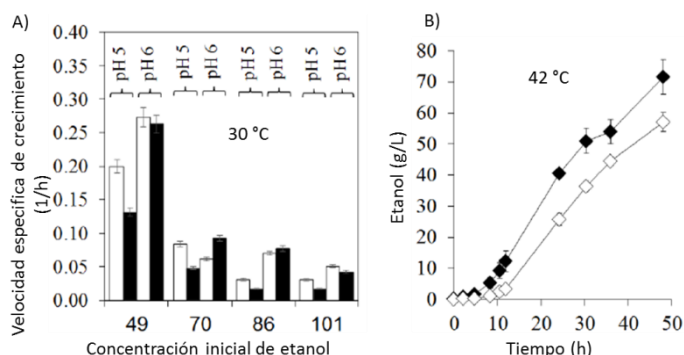


Figura 1. Toxicidad del etanol y producción de etanol a 42 °C y pH 6. Las barras y rombos blancos representan a la cepa S288C y las barras y rombos negros a la TT23. A) al aumentar el pH de 5 a 6 beneficia a ambas cepas, aunque con un mayor beneficio para la TT23. B) Se observa una clara ventaja en la producción de etanol de la cepa TT23 sobre su parental al aumentar la temperatura del cultivo a 42 °C.

Conclusiones. A través de los cambios genéticos generados por la evolución adaptativa en laboratorio a elevada temperatura y un cambio de un parámetro fisicoquímico en la fermentación (de pH 5 a 6), fue posible convertir una cepa de laboratorio en una cepa productora de etanol para fermentaciones a 40 °C.

Agradecimientos. Al CONACyT por la beca de maestría de Arturo Montes de Oca y a el Programa para el Desarrollo Profesional Docente para el Tipo Superior (PRODEP), subvención: DSA / 103.5a / 14/10703.

Bibliografía.

- Demian, A. (2009) *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36:319-332.
- Cavalheiro, A & Monteir, G. (2013) *Braz J Microbiol.* 44:665-671.
- Banat, A, et al (2010) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:861-867.
- Caspeta, L & Nielsen, J. (2015) *mBio* 6:1-9.
- Lam, F, et al (2015) *Science.* 346:71-75.

