

Gabriela Luciani
Marina Díaz
Félix Martínez-Macías
Déborah Salomón
Viviana Echenique

La Dra. Gabriela Luciani es Investigadora Asistente del CONICET y docente del Departamento de Agronomía de la UNS. La Dra. Mariña Díaz es docente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. El Lic. Félix Martínez Macías es estudiante de Maestría en la Universidad de Valencia, España. La Lic. Debora Salomón es becaria de la ANPCyT. La Dra. Viviana Echenique es Investigadora Independiente de CONICET-CERZOS-UNS y docente del Departamento de Agronomía de la UNS.
Contacto: echeniq@criba.edu.ar

Cultivos diseñados por ingeniería genética

Una alternativa atractiva para la producción de biocombustibles

Parte II

En la producción de biocombustibles los desafíos son nuevos: la reducción de los costos de los pre-tratamientos que remueven la lignina, la producción de enzimas que convierten a la celulosa y hemicelulosas de la pared celular en azúcares, y la fermentación de los azúcares simples en etanol. Y en todos ellos, el denominador común es la reducción y/o modificación del contenido de lignina de la pared celular.

Para ser una alternativa viable, los biocombustibles deben producirse sin afectar la provisión de alimentos, sin costos ambientales, con ganancias energéticas netas y estar disponibles en el mercado en forma competitiva. En este sentido, el uso de prácticas conservacionistas y cultivos lignocelulósicos con menores costos agropecuarios y en zonas marginales brindaría más beneficios a nivel económico y ambiental.

En este contexto, se consideran cultivos lignocelulósicos a aquellos cultivos cuyas paredes celulares, formadas principalmente por celulosa y lignina, se emplean como fuente primaria para la producción de biocombustibles. Estos cultivos incluyen no sólo cereales, de los cuales se aprovechan los desechos o rastrojos (trigo, arroz, maíz, avena, cebada, etc.) sino también pasturas perennes (pasto elefante, pasto varilla, pasto llorón, etc.).

Los biocombustibles, comparados con las naftas y el diesel, presentan varias ventajas a nivel energético,

económico y ambiental. Según Hill y colaboradores (2006), la producción de biocombustibles produce un balance energético neto positivo (del 25 y 93% para biodiésel y bioetanol, respectivamente) y una significativa reducción en la emisión de gases (del 12 y 41% para biodiésel y bioetanol, respectivamente). Los menores márgenes en las estimaciones para la producción de bioetanol se deben a los costos más elevados que requiere el cultivo de maíz (*i.e.* fertilizantes y pesticidas), y a los mayores costos de conversión que incluyen la digestión y/o hidrólisis enzimática, la fermentación y la destilación para la obtención del etanol como producto final. En este sentido, Tilman y colaboradores (2006) sugieren que el empleo de una mezcla de pasturas nativas perennes aportaría grandes beneficios, que incluirían una mayor producción de energía útil y una mayor reducción en el efecto invernadero y en el uso de agroquímicos. Además, dichas pasturas ocuparían suelos marginales o degradados sin desplazar cultivos destinados a la alimentación humana o animal ni afectar

la biodiversidad.

Desafíos actuales en la producción de etanol

En función de la disponibilidad de una gran cantidad de biomasa como recurso renovable y de nuevas tecnologías y la conservación del medio ambiente, los esfuerzos de países como Estados Unidos y Brasil se han centrado en la producción de biocombustibles. Así, la mayoría de los esfuerzos de investigación en la línea de producción están enfocados en tres desafíos: 1. reducir los costos de los pretratamientos que eliminan la lignina y permiten el acceso de las enzimas hidrolíticas a las microfibrillas de la pared, 2. reducir los costos de la producción de enzimas, como las celulasas microbianas, que convierten a la celulosa y hemicelulosas de la matriz en azúcares fermentables, y 3. reducir los costos de la fermentación de los azúcares simples en etanol (Sticklen, 2008). La optimización de cada uno de estos factores aumenta la rentabilidad de la producción y la vuelve una alternativa



más apetecible tanto en pequeña como gran escala.

1. *Pretratamientos*: un pretratamiento eficiente implica que la biomasa se degrada permitiendo la accesibilidad de las enzimas celulósicas y disminuyendo la interferencia de los otros componentes de la matriz de la pared. Así, todos los pretratamientos aumentan la superficie de exposición, eliminan hemicelulosas, eliminan o alteran la composición de la lignina y degradan la celulosa en mayor o menor grado. Los pretratamientos son físicos e incluyen la molienda, tanto húmeda como seca, y la hidrólisis a altas temperaturas. En cambio, los pretratamientos químicos incluyen el agregado de aditivos como ácidos o bases —generalmente ácido sulfúrico e hidróxido de sodio— para promover

La mayoría de los esfuerzos de investigación están enfocados en reducir los costos de los pretratamientos que eliminan la lignina, los de la producción de enzimas y los de la fermentación de los azúcares simples en etanol.

la hidrólisis e incrementar el rendimiento de glucosa mediante la eliminación de hemicelulosas y/o lignina.

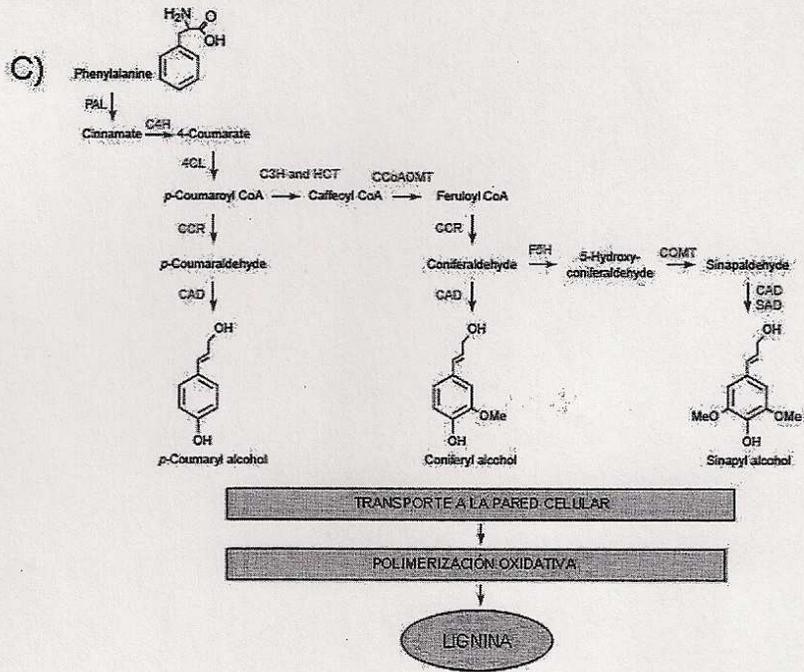
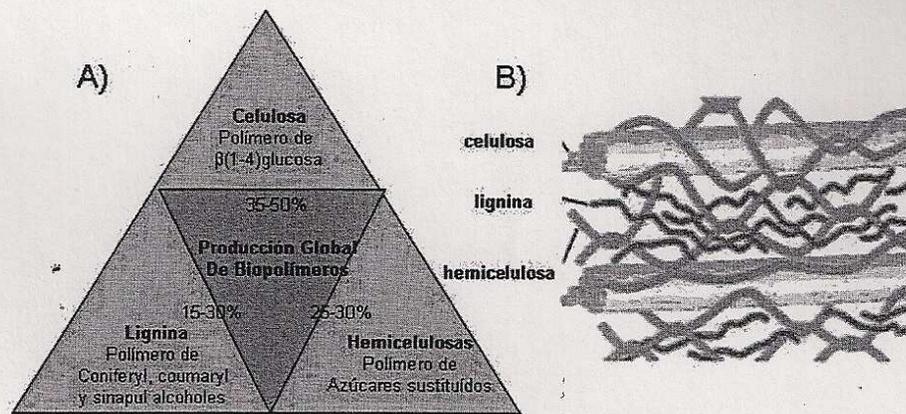
2. *Costos de enzimas*: las enzimas involucradas en la degradación de la celulosa comprenden tres grupos: endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. Las endoglucanasas cortan las fibrillas de celulosa en su interior dejando libres sus extremos; las exoglucanasas cortan esos extremos libres en dímeros de glucosa llamados celobiosa y, finalmente, las β -glucosidasas cortan esos dímeros liberando las moléculas de glucosa. Sin embargo, la producción de estas enzimas a escala comercial es aún costosa. En este sentido, nuevas líneas de investigación se han enfocado tanto en el desarrollo de enzimas con tolerancia a

altas temperaturas y mayores actividades específicas, como en el desarrollo de otras enzimas involucradas en la degradación de otros polímeros específicos de la pared.

3. *Fermentación de azúcares*: entre las tecnologías más estudiadas para mejorar la tasa de conversión de la biomasa en etanol se encuentra el bioprocesado consolidado. En este proceso, la producción de celulosa, la hidrólisis de celulosa y la fermentación de la glucosa ocurren en forma simultánea. Este enfoque está basado en el desarrollo de microorganismos genéticamente modificados —ya sean microorganismos celulósicos modificados para mejorar el rendimiento y eficiencia en la producción de etanol, o microorganismos no celulósicos, modificados para expresar la batería de enzimas necesarias para la degradación de la celulosa—.

Rol de la lignina en la producción de biomasa lignocelulósica

En los cultivos empleados para la producción de biocombustibles, la biomasa se ve representada en un



35-50% por celulosa, 25-30% por hemicelulosas (ambos polímeros de la glucosa fácilmente degradables) y 15-30% por lignina (polímero formado por tres residuos de alcoholes, difícilmente degradables) (Figura 1A). Estas tres moléculas se encuentran formando una red de fibrillas interconectadas entre las cuales también existen proteínas y compuestos fenólicos de bajo peso molecular en la pared celular (Figura 1B). Así, la lignina aparece durante el crecimiento secundario de las plantas y se encuentra asociada al desarrollo de tejidos especializados involucrados en el soporte y rigidez, la protección contra la desecación y el ataque de patógenos. Este polímero se sintetiza

a partir de una molécula precursora que es la fenilalanina y siguiendo la vía metabólica de los fenilpropanoides y de los monolignoles, produce tres residuos conocidos como alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico, que finalmente se unen formando las fibrillas de lignina (Figura 1C). Estudios previos indican que la eliminación de la lignina es el factor más importante para el mejoramiento de la digestibilidad enzimática y el rendimiento de azúcares simples necesarios a partir de materiales como maderas blandas y residuos de maíz. En este sentido, la lignina interfiere adsorbiendo las enzimas celulósicas de forma irreversible e impidiendo su acceso a las microfibrillas

de celulosa embebidas dentro de la pared (Vermeris *et al.*, 2007).

Degradación de la biomasa lignocelulósica: modificación de la lignina

También, la ingeniería genética permite modificar los cultivos y diseñarlos en función de las demandas de la industria. De esta manera pueden reducirse los costos de producción, aumentando tanto el rendimiento como la tasa de conversión de la biomasa mediante la modificación y/o reducción en el contenido de lignina, el aumento en el contenido de celulosa y la expresión de celulasas y ligninasas, para la degradación de la

celulosa y lignina, respectivamente (Sticklen, 2006). Entre las ventajas de disminuir y/o modificar el contenido de lignina en las plantas se encuentran la reducción de los costos de los pretratamientos en la producción de biocombustibles, el incremento del rendimiento en la producción de la pulpa de papel y el incremento de la digestibilidad de los forrajes con el concomitante aumento en la producción animal (Ragauskas *et al.*, 2006).

Las estrategias para disminuir o modificar el contenido de lignina han incluido la sobreexpresión o el silenciamiento de uno o varios genes de enzimas directa o indirectamente involucradas en la síntesis de los monolignoles, en su polimerización y/o transporte. Por ejemplo, la reducción de la expresión de la enzima 4CL disminuyó un 45% el contenido de lignina e incrementó un 15% el contenido de celulosa en álamo (Hu *et al.*, 1999). En un estudio posterior se



eliminación de los pretratamientos. En particular, estas plantas tuvieron una reducción del 40% en el rendimiento de biomasa, pero un aumento del 166% en el rendimiento de azúcares fer-

mentables, lo cual indica que el rendimiento en azúcares supera con creces la pérdida de biomasa.

Por lo tanto, estos genes serían candidatos muy interesantes para mejorar el rendimiento de los azúcares fermentables en otros cultivos bioenergéticos, tales como álamo, pasto varilla y pasto elefante (Ralph *et al.*, 2006; Chen y Dixon, 2006). Además, cabe destacar que si bien la reducción y/o modificación en la composición del contenido de lignina facilita el acceso de las enzimas celulósicas a las microfibrillas de la pared, la lignina es un producto muy valioso, ya que permite la generación de energía eléctrica para el funcionamiento de las biorrefinerías.

observó que los árboles transgénicos deficientes en 4CL y ricos en CAld5H no sólo mostraron un 30% más de celulosa y un 52% menos de lignina sino también modificaron la proporción relativa de los monolignoles facilitando la degradación de la lignina (Li *et al.*, 2003).

Los mismos fenómenos, *i.e.* modificación de las proporciones relativas de los monómeros, reducción del contenido y aumento de la degradabilidad de lignina, se observaron en plantas transgénicas de alfalfa deficientes en HCT y C3H, favoreciendo no sólo un mayor rendimiento de pulpa en árboles y una mayor digestibilidad en especies forrajeras, sino también permitiendo inclusive la

Literatura citada

Chen F. and R. A. Dixon. 2006. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nat. Biotechnol.* 25: 759-761.

Hill J., E. Nelson, D. Tilman, S. Polasky and D. Tiffany. 2006. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *PNAS* 103: 11206-11210.

Hu W. J., S. A. Harding, J. Lung, J. L. Popko, J. Ralph, D. D. Stokke, C. J. Tsai, and V. L. Chiang. 1999. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation

and growth in transgenic trees. *Nat. Biotechnol.*: 808-812.

Li L., Y. Zhou, X. Cheng, J. Sun, J. M. Marita, J. Ralph, and V. L. Chiang. 2003. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *PNAS* 100: 4939-4944.

Ragauskas A. J., C. K. Williams, B. H. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C. A. Eckert, W. J. Frederick Jr., J. P. Hallett Leak, C. D. Charles, L. Liotta, J. R. Mielenz, R. Murphy, R. Templer, and P. Tschaplinski. 2006. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science* 311: 484-489.

Ralph J., T. Akiyama, H. Kim, F. Lu, P. F. Schatz, J. M. Marita, S. A. Ralph, M. S. Srinivasa, R. Reddy, F. Chen, and R. A. Dixon. 2006. Effects of Coumarate 3-Hydroxylase Down-regulation on Lignin Structure. *J. Biol. Chem.* 281: 8843-8853.

Sticklen M. (2006) Plant genetic engineering to improve biomass characteristics for biofuels. *Curr. Op. in Biotechnol.* 17: 315-319.

Sticklen M. B. (2008) Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Rev Genetics* 9: 433-443.