

# BIOCOMBUSTIBLES Y BIORREFINERÍAS: UNA ASOCIACIÓN ENTRE LA BIOTECNOLOGÍA Y LA INGENIERÍA QUÍMICA

Vanina Márquez, Laboratorio de Fermentaciones, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), UNL.

Alejandro Beccaria, Laboratorio de Fermentaciones, FBCB, UNL.

Mabel Aleanzi, Laboratorio de Enzimología Molecular, FBCB, UNL- CONICET.

Sergio Guerrero, Laboratorio de Bioquímica Microbiana, FBCB, UNL- CONICET.

Carlos Querini, INCAPE, UNL-CONICET

Alberto Iglesias, Laboratorio de Enzimología Molecular, FBCB, UNL- CONICET.

Contacto:

Dr. Alberto Iglesias

TE.: ++54 (0) 342 4575 206 int. 217. e-mail: iglesias@fbc.unl.edu.ar

## Sobre microalgas y otras hierbas



Figura 1: Microfotografías de células de "Spirulina" (*Arthrospira sp.*, perteneciente a la colección de microalgas de nuestro grupo).

La imagen izquierda corresponde a una microfotografía tomada con un microscopio óptico; mientras que la imagen derecha corresponde al mismo preparado, observando la fluorescencia roja de la clorofila. Ambas fueron obtenidas con un microscopio Olympus CX 31, equipado con sistema de fluorescencia y cámara fotográfica digital.

### Una presentación de los biocombustibles.

Asociados al manejo del fuego por el hombre o sus ancestros inmediatos, los biocombustibles pueden definirse como aquellos materiales combustibles que son de origen biológico. Así, se incluye la leña entre los biocombustibles de naturaleza sólida; los alcoholes obtenidos de productos vegetales (caña de azúcar, maíz, etc.) y los aceites vegetales y sus derivados (biodiesel) entre los líquidos y metano (biogas) obtenido por fermentación anaeróbica de material orgánico, entre los gaseosos.

Si bien es claro el origen fósil de los hidrocarburos, éstos son excluidos del grupo de los biocombustibles por su remota formación.

Un grupo importante de biocombustibles es producido por microorganismos. Estos procesos de producción transcurren en plantas industriales denominadas biorrefinerías, por analogía con la industria (petro) química, y se emplean diferentes materias primas de origen biológico. El conocido alcohol etílico es principalmente obtenido por síntesis microbiana, empleando subproductos de la industria azucarera o almidones de maíz.

### Las polifacéticas microalgas.

El concepto de microalga -desde una perspectiva aplicada- se reduce a un grupo de microorganismos con capacidad de realizar fotosíntesis. En términos generales, la fotosíntesis es el proceso por el cual ciertos organismos biológicos pueden utilizar la energía lumínica para producir moléculas orgánicas (primariamente hidratos de carbono) a partir de dióxido de carbono (forma inorgánica del carbono mayoritaria en el aire) y agua. En un lenguaje biológico, un organismo fotosintético es considerado autotrófico, por tener una

autonomía para proveerse de nutrientes. El interés tecnológico por las microalgas radica en su elevado potencial productivo utilizando la energía solar. Estrictamente, algunos de estos microorganismos pueden también crecer sin realizar fotosíntesis (biológicamente llamado crecimiento heterotrófico, por existir una falta de autonomía en la provisión de nutrientes) o de manera mixta (crecimiento mixotrófico), combinando ambas condiciones. Estas características polifacéticas para el crecimiento, en algunos casos constituyen una ventaja para el desarrollo de estrategias de uso de las microalgas con fines biotecnológicos.

A escala industrial se desarrolla el cultivo de diversas microalgas, las que se emplean con distintos fines, como el alimenticio y médico. Así, está bien descrito el cultivo de *Arthrospira platensis* y *Arthrospira maxima*, especies de microalgas conocidas como "Spirulina"; las que se comercializan como suplemento nutritivo. Una característica sobresaliente de "Spirulina" es que pertenece a un grupo de microorganismos que, además de utilizar el dióxido de carbono (por ser fotosintéticos), también pueden utilizar el nitrógeno molecular (forma inorgánica del nitrógeno que constituye aproximadamente el 80% del aire). De esta forma, "Spirulina" posee una muy alta capacidad de crecimiento autotrófico, ya que puede desarrollarse netamente a partir de componentes inorgánicos y luz. En la Fig. 1 se muestran fotografías de células de "Spirulina". Debido a sus propiedades biológicas, esta microalga es fácilmente digerible y con un adecuado balance de nutrientes, que incluyen fundamentalmente: aminoácidos, vitaminas y minerales. Además, producen compuestos con características antioxidantes, cualidad actualmente considerada muy beneficiosa para la salud por la acción de los mismos en el retardo del envejecimiento celular. El cultivo de "Spirulina" se realiza tradicionalmente en medios líquidos contenidos en piletas, las que están ubicadas en invernaderos con expo-

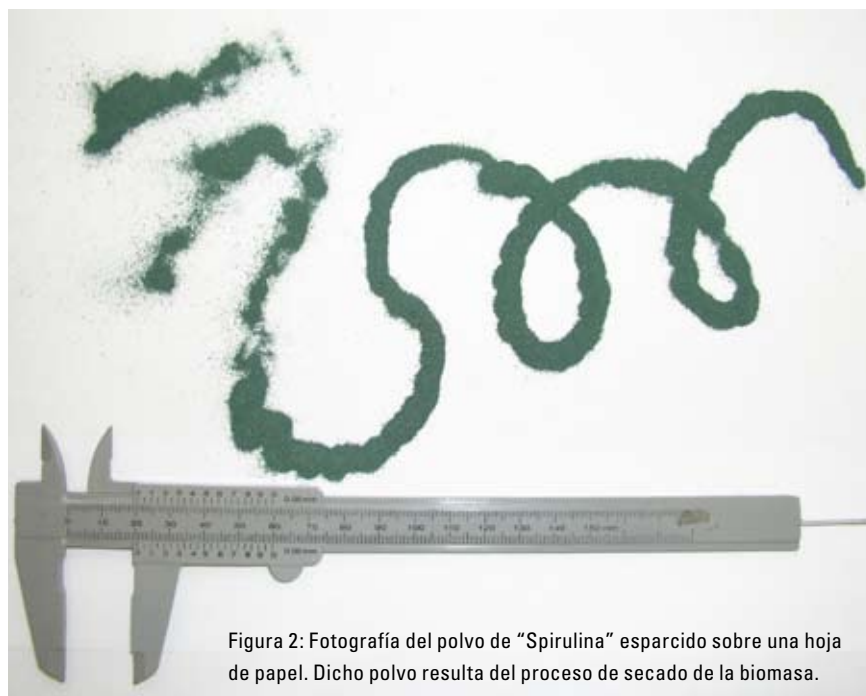


Figura 2: Fotografía del polvo de "Spirulina" esparcido sobre una hoja de papel. Dicho polvo resulta del proceso de secado de la biomasa.

sición a la luz solar. Estas piletas están construidas de tal forma que permiten la inmersión de paletas de molinos, las que realizan el mezclado del cultivo. Esta operación de mezclado es requerida para facilitar la disponibilidad de los nutrientes disueltos a las células del microalga, y (entre otras acciones positivas) favorecer el mantenimiento de una temperatura y energía lumínica adecuadas. Luego de un tiempo de cultivo, éste alcanza su "madurez" -que en términos microbianos es equivalente a una concentración de células algunos órdenes de magnitud superior a la inicial- y se procede a cosecharlo. La cosecha implica la separación de las células de "Spirulina" del medio líquido, operación que puede realizarse aplicando diferentes técnicas; como, por ejemplo, filtración. Las células obtenidas en esta etapa, con un elevado grado de humedad, son lavadas y secadas. En la Fig. 2 se muestra el aspecto macroscópico de "Spirulina" obtenida mediante el procedimiento descrito. Este polvo es incluido en cápsulas, que es la forma habitual de comercialización para el consumo humano. También es explotada comercialmente la producción del microalga *Dunaliella sp.*, debido a su elevada

producción de -caroteno, un precursor de la vitamina A. La tecnología de cultivo empleada es similar a la descrita para "Spirulina". A escala industrial, se cultivan también microalgas que pertenecen al grupo de microorganismos conocidos como "oleaginosos". Esta categoría se debe a que producen y acumulan gran cantidad de aceites, los que son adecuados en la alimentación del ser humano ya que se asocian al normal funcionamiento del organismo, regulando la respuesta del sistema inmunológico y evitando el desarrollo de ciertas patologías como la enfermedad de Alzheimer. El aporte de estos aceites de algunos ácidos grasos (los famosos "omega-3" y "omega-6") resultan también altamente beneficiosos para disminuir los niveles de lípidos (incluyendo el colesterol, especialmente el llamado "colesterol malo") en el organismo humano y así reducir los riesgos de enfermedades cardiovasculares, una temida y frecuente patología de la sociedad sedentaria actual. Dentro de las microalgas aceiteras se encuentra la especie denominada *Phaeodactylum tricornutum*, de cuyas células se muestra una imagen en la Fig. 3. Esta especie produce, con elevado rendimiento, un ácido

## Bibliografía

- Apt, K., Behrens, P. (1999) Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of Phycology* 35: 215-226.
- Ben-Amotz, A. (2004). Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products. Major industries species. En: *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*. Richmond, A. (ed.) Blackwell Publishing Co. (Oxford).
- Das, U. (2008) Beneficial actions of polyunsaturated fatty acids in cardiovascular diseases: But, how and why? *Current Nutrition & Food Science* 4: 2 – 31.
- Fernandez, I. (2004) Ácidos grasos esenciales y sistema inmune. *Revista FABICIB* 8: 269 – 81.
- Ma, Q-L., Teter, B., Ubeda, O. J., Morihara, T., Dhoot, D., Nyby, M. D., Tuck, M. L., Frautschy, S. A., Cole, G. M. (2007) Omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid increases SorLA/LR11, a sorting protein with reduced expression in sporadic Alzheimer's disease (AD): relevance to AD prevention. *The Journal of Neuroscience* 27:14299 – 307.
- González, D. H., Iglesias, A. A., Podestá F. E., Andreo, C. S. (1989) Metabolismo Fotosintético del Carbono en Plantas Superiores. *Investigación y Ciencia*: 151: 84 – 92.
- Iglesias A. A., Andreo, C. S. (1991) La Asimilación Fotosintética del Carbono en Plantas C4. En: *Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes Vol. I. Fotosíntesis: Aspectos Fisiológicos y de Estrés*. Cap. 3, pp. 63-84 (J. López Gorgé, ed.) Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), España.
- Iglesias, A. A., Andreo, C. S. (1994) Agua, Carbono, Luz y Vida. *Ciencia Hoy* 5 (27): 41 – 55.
- Olaizola, M. (2003) Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Bio-molecular Engineering* 20: 459 – 66.
- Poli, A. et al. (2008) Non-pharmacological control of plasma cholesterol levels. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 18: 1 – 16.
- Pulz, O., Gross, W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 635 – 48.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006) Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 87 – 96.
- Tomaselli, L. (2004) The microalgal cell. En: *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*. Richmond, A. (ed.) Blackwell Publishing Co. (Oxford).



Figura 3: Microfotografías de células de *Phaeodactylum tricornutum* (cepa aislada por nosotros e integrada a la colección de microalgas de nuestro grupo). La imagen superior muestra un campo donde se observa (dentro del círculo de color amarillo) el aspecto típico de la célula de “tres puntas o cuernos” que da el nombre a la especie. La imagen inferior izquierda corresponde a las células tal cual son vistas en un microscopio óptico, mientras que la de derecha corresponde al mismo preparado mostrando la fluorescencia de la clorofila.

graso muy valioso, denominado ácido eicosapentaenoico (de la serie de los “omega-3”). Otro ácido graso de esta serie es el docosahexaenoico, producido por otras especies de microalgas. En la dieta humana, la fuente de estos ácidos grasos son principalmente los pescados, especialmente los de regiones frías. Sin embargo, no son producidos por estos animales, sino tan sólo acumulados en sus tejidos; siendo las microalgas los verdaderos productores primarios en la cadena alimenticia de los peces. Para el cultivo de especies aceiteras de microalgas se emplean dispositivos especiales conocidos como fotobiorreactores. Consisten en recipientes construidos de materiales transparentes, donde se incluyen sistemas de burbujeo de gases (especialmente el dióxido de carbono, necesario para la fotosíntesis), agitadores (para homogeneizar el cultivo) y algunos sensores que permiten conocer el estado fisiológico de las células y automatizar ciertas variables críticas del cultivo.

En la Fig. 4 se muestra una fotografía de un fotobiorreactor de laboratorio. Una vez que el cultivo se desarrolló y el aceite contenido dentro de las células alcanza su máxima concentración, se procede a la cosecha mediante procedimientos similares al descrito previamente. Para extraer el aceite, la masa de células debe romperse, lo que puede realizarse mediante procedimientos físicos o químicos. El aceite extraído es purificado y conservado adecuadamente para evitar su oxidación por el oxígeno del aire, ya que en este proceso se descompondrían principalmente los ácidos grasos “omega-3” y “omega-6”.

Entre las microalgas aceiteras de interés industrial se ubican algunas otras especies como *Chlorella pyrenoidosa*, cuyo perfil de aceite es ponderado especialmente para la síntesis de biodiesel. El biodiesel es un tipo de combustible sintético, capaz de reemplazar al diesel o gasoil empleado para el funcionamiento de motores. En su proceso de produc-

ción se emplean aceites vegetales o grasas animales y se caracteriza por reemplazar un alcohol -el glicerol, al que se unen químicamente los ácidos grasos- por otro -generalmente metanol-.

En la actualidad, cuando la materia prima que se emplea en la síntesis del biodiesel son los aceites vegetales, se genera (en algunos casos) un conflicto ético relacionado a la distracción de recursos alimenticios y/o de suelos fértiles para la producción de combustibles. En principio, este inconveniente sería subsanado por el empleo de aceites obtenidos del cultivo de microalgas no alimenticias, que crecen sin competir directamente con las plantas por las zonas de crecimiento. Además, el empleo de otros nutrientes para las microalgas (distintos a la luz solar, aprovechando las características polifacéticas auto-, hetero- y mixotróficas de algunas de ellas) y obtenidos desde materiales de desecho, incrementan los rendimientos de aceites en los cultivos de éstas.

Por otra parte, las microalgas poseen una promisoriosa aplicación en la biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados y en la producción de hidrógeno. Este último gas es considerado como una opción de importancia para el futuro, principalmente como vector energético para almacenar energía; y porque su uso como tal es completamente compatible con la pureza del medio ambiente, ya que la combustión (u oxidación) del hidrógeno genera agua. La producción de hidrógeno por las microalgas está directamente asociada con la capacidad de las mismas de generar el gas. En algunos casos, incluso, la producción de distintas cantidades de hidrógeno es una estrategia utilizada por estos microorganismos para flotar a distintas alturas en ambientes acuáticos; lo que les permite usar más eficientemente microentornos con características químicas específicas, así como ciertas zonas del espectro de luz solar que no son utilizadas por las plantas y otros organismos fotosintéticos.

Nuestro grupo de trabajo viene realizando desde hace tiempo trabajos relacionados al aislamiento, conservación y optimización de las condiciones de cultivos de diferentes microalgas de interés industrial. También, se ha trabajado en la caracterización de diferentes enzimas del metabolismo de estos microorganismos. En términos más sencillos, esto último implica el estudio de las diferentes reacciones químicas que tienen lugar dentro del organismo (metabolismo) y los catalizadores específicos o componentes proteicos (enzimas) que aceleran cada una de dichas reacciones y que así permiten la ocurrencia orquestada del metabolismo. La caracterización de dichas enzimas es un aporte clave al conocimiento de las vías de síntesis de los aceites y demás componentes genéricos y característicos de cada especie de microalga.

Actualmente, y capitalizando la experiencia ganada, se está iniciando un proyecto multidisciplinario relacionado a la obtención de biodiesel desde aceites de microalgas. En el mismo participan investigadores

de CONICET y de las Facultades de Bioquímica y Ciencias Biológicas y de Ingeniería Química de la UNL. Estos proyectos poseen un impacto ambiental doblemente positivo, ya que persiguen reciclar el carbono atmosférico, y emplear materiales lignocelulósicos de desecho como posible fuente de carbono para el desarrollo de microorganismos. Los objetivos generales se detallan a continuación:

Buscar, clonar, expresar y caracterizar enzimas lignocelulolíticas bacterianas que permitan obtener azúcares asimilables por microalgas cultivadas mixotróficamente (es decir, en presencia de luz solar y una fuente de carbono orgánica) para la obtención de aceite unicelular.

Caracterizar cinética, regulatoria y estructuralmente las enzimas que degradan los polisacáridos estructurales de los vegetales (celulosa y lignocelulosa). Verificar la cantidad y calidad del aceite obtenido por las diferentes variedades de microalgas, las modificaciones implementadas a su cultivo y el impacto que las características del aceite tengan tanto en el proceso productivo de biodiesel, como en las propiedades de este último.



Figura 4: Fotografía de un fotobiorreactor de laboratorio, empleado para el crecimiento de microorganismos fotosintéticos, como las microalgas. Las referencias numéricas corresponden a: 1) sistema de control del fotobiorreactor (agitación, iluminación, etc.); 2) filtro esterilizante en la línea de ingreso de gases; 3) eje del agitador del vaso; 4) panel hemisférico de iluminación, constituido por 12 tubos fluorescentes de 15 W; 5) vaso del biorreactor, en el cual se desarrolla el cultivo del microorganismo en condiciones controladas; 6) frascos para la inoculación, toma de muestras, agregado de sustancias, etc.; 7) frasco lavador de gases provenientes del cultivo.