

Producción de hidrocarburos biológicos utilizando un subproducto agroalimentario como sustrato

Production of biological hydrocarbons using an agrifood product as a substrate

Kesia M. Barrows¹, Ubaldo Ábrego-Delgado¹, Grimaldo Ureña-Matos^{1,2}, Indira Franco^{1,3}

¹Grupo de Investigación de Biotecnología, Bioinformática y Biología de Sistemas; Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales, Universidad Tecnológica de Panamá, ² Dirección de Investigación, Universidad Tecnológica de Panamá,

³ Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad Tecnológica de Panamá
kesiabarrows@gmail.com, indira.franco@utp.ac.pa

Resumen— La melaza es el residuo agroindustrial que no cristaliza resultante del procesamiento de la caña en la obtención de azúcar refinada. Tiene una amplia gama de usos destacándose, en el país, el dado en la alimentación bovina. Sin embargo, actualmente con el problema de la sostenibilidad energética, el hombre debe encontrar alternativas de fuentes que sean renovables, principalmente el área de combustibles líquidos para el sector transporte y se podría encontrar una alternativa en la melaza como fuente primaria para la obtención de biocombustibles. La Biología Sintética consiste en la síntesis de sistemas complejos de base biológica que realizan funciones que no existen normalmente en la naturaleza. Actualmente es uno de los campos de investigación más vanguardistas en el que se combinan la biología y la ingeniería. El objetivo de esta investigación consistió en utilizar la melaza como sustrato principal en el cultivo bacteriano M9 para obtener alcanos de origen biológico. Las bacterias utilizadas fueron *Escherichia coli* K12 que se modificaron genéticamente para que expresaran la enzima Acyl-ACP Reductasa (AAR) y la Aldehído Descarboxilasa (ADC) de *Synechococcus elongatus* PCC7942, modificación realizada con métodos desarrolladas por la biología sintética.

Palabras claves— Alcanos, biobricks, biología sintética, melaza, residuo agroindustrial.

Abstract— Molasses is the agro-industrial waste that does not crystallize resulting from the processing of sugarcane in the production of refined sugar. It has a wide range of applications standing in the country, as in cattle food. However, today with the problem of energy sustainability, men must find alternative sources that are renewable, mainly in the area of liquid fuels for the transportation sector and we could find an alternative molasses as a primary source for obtaining biofuel. Synthetic biology is the synthesis of complex biologically based systems that perform functions that don't exist in nature normally. Today is one of the most advanced research fields in which biology and engineering are combined. The objective of this research was to use molasses as the main substrate in M9 medium for alkanes of biological origin. The bacteria used were *Escherichia coli* K12 that are genetically modified to express the Acyl-ACP reductase (AAR) and the Aldehyde Decarboxilase (ADC) *Synechococcus elongatus* PCC7942, modification made with methods developed by synthetic biology.

Keywords— Alkanes, BioBricks, synthetic biology, molasses, agroindustrial residue.

Tipo de artículo: Original

Fecha de recepción: 15 de septiembre de 2015

Fecha de aceptación: 13 de diciembre de 2015

1. Introducción

Los residuos agroindustriales se han convertido desde hace unos años en foco de investigación, debido a los muchos nutrientes que se encuentran en los mismos y los cuales pueden ser aprovechados, desde el punto de vista nutricional o como fuente de energía [1]. En Panamá la producción media anual es de 13 millones de galones de melaza, residuo resultante del proceso de refinación de azúcar de caña en los centrales azucareros [2]. En el país son cuatro los centrales

dedicados a la producción de azúcar, y dos que elaboran exclusivamente licores.

La biología sintética es el diseño y construcción de dispositivos, así como de sistemas biológicos con fines útiles [3]. Ésta combina la biología y la ingeniería para diseñar sistemas biológicos con funciones nuevas que no se encuentran en la naturaleza [4]. Engloba gran variedad de enfoques, metodologías y disciplinas orientadas a la ingeniería genética y la biotecnología. Busca la creación de nuevos organismos programables, microorganismos que se comporten como pequeños ordenadores que el ser humano sea capaz de programar.

Al utilizar la biología sintética se podría lograr que una cepa particular de una bacteria como *E. coli* (*Escherichia*

coli) K12 competente produzca hidrocarburos de cadena larga partiendo de residuos agroindustriales con alto contenido de sacáridos, como por ejemplo la melaza, siguiendo una ruta metabólica que se ha observado en plantas y cianobacterias. Estos hidrocarburos pueden ser utilizados como combustibles líquidos. El experimento de Cheesbrough y Koattukudy (1984) utilizando *Pisum sativum*, siguiendo los resultados de los trabajos de Kolattukudy en 1967 y 1980, fue uno de los primeros en demostrar que la descarbonilación de aldehídos grasos para la producción de alcanos era la ruta para la formación de los mismos en los sistemas biológicos. El alcano más abundante reportado en esta bacteria fotoautótrofa es el heptadecano. Estas cadenas de alcanos son consistentes con la regla de contener “n-1” átomos de carbono que el aldehído graso descarbonilado del cual procede (generalmente de cadena par n) [5].

El objetivo de esta investigación consiste en utilizar la melaza como única fuente de carbono en el medio de cultivo M9 para obtener alcanos de origen biológico. Se inocularon bacterias de la cepa *E.coli* K12 que fueron previamente modificadas genéticamente para que expresaran la enzima Acyl-ACP Reductasa (AAR) y la Aldehído Descarbonilasa (ADC) de *Synechococcus elongatus* PCC7942.

2. Materiales y Métodos

En la realización de esta investigación se utilizó el plásmido BBa_K590025, secuencia de ADN con promotor constitutivo para la expresión de proteínas, *backbone* pSB1C3 que posee resistencia al *cloranfenicol* (Kit de iGEM Spring 2012 DNA Distribution. Ver figura 1 y figura 2).

2.1 Medios de cultivo

- LB (*Lysogeny Broth*). Se preparó 1l de medio LB con 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de Cloruro de Sodio (NaCl).
- SOC (*Super Optimal Broth*). Se preparó 500 mL de medio SOC utilizando 10 g de triptona, 2.5 g de extracto de levadura, 0.25 g de Cloruro de Sodio (NaCl), 0.1 g de Cloruro de Potasio (KCl). Se almacenó a temperatura de refrigeración y al momento de usar el medio SOC se le agregó por cada 100 mL de medio, 2 mL de glucosa 1M (18 %) y 1 mL de dicloruro de magnesio (MgCl₂) 1M, previamente filtrados con filtros de 0.2 μm para que estuvieran estériles.

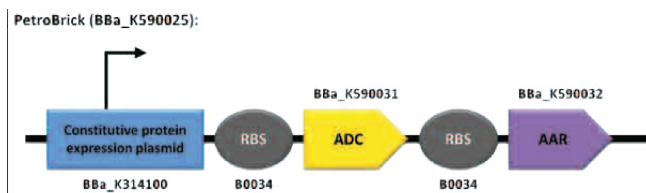


Figura 1. Contenido genético del BioBrick K590025, del Kit iGEM Spring 2012 DNA Distribution. Codifica para la expresión de las enzimas Aldehído Descarbonilasa (ADC) y Acyl-ACP Reductasa (AAR). Imagen adaptada de iGEM 2011, grupo Washington [6].

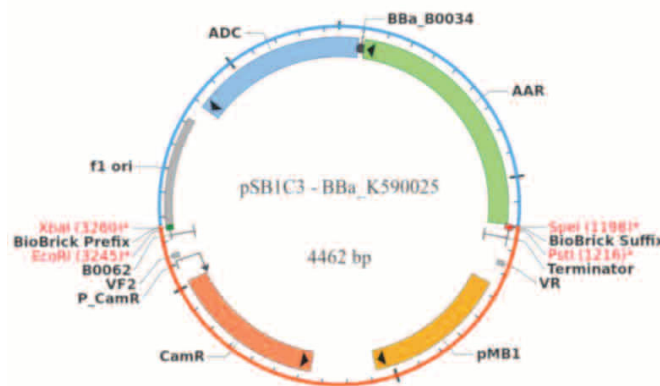


Figura 2. Estructura de un plásmido. “Biobrick” BBa_K590025 en el “backbone” pSB1C3 (resistencia *cloranfenicol*). Fuente: Part registry, part: Bba_K590025 [7].

- M9-Modificado. Se preparó de la siguiente manera: a 75 mL de agua desionizada, 3 g de melaza se le adicionan 0.6 g de hidrógeno fosfato de sodio (Na₂HPO₄), 0.3 g de hidrógeno fosfato de potasio (KHPO₄), 0.05 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.2 g de cloruro de amonio (NH₄Cl), 10 mL de bis-tris 1 M (pH 7.25), 1 mL de triptona 10 %, 100 μL de tiamina 1mg / mL, 100 μl de tricloruro de hierro hexa-hidratado (FeCl₃•6H₂O) y 100 μL de sulfato de magnesio (MgSO₄).
- Medio sólido con y sin antibiótico. Se mezcló 100 mL de medio con 1.5 g de agar. Las placas con antibiótico tenían una concentración final de 25 μg / mL de antibiótico.

2.2 Caracterización de la melaza utilizada

Todas las determinaciones analíticas se realizaron en triplicado. Los valores de los distintos parámetros fueron expresados como la media ± desviación estándar.

La melaza de caña de azúcar fue donada por una industria dedicada al procesamiento del azúcar. Se mantuvo bajo refrigeración (<10 °C). Su contenido de humedad, cenizas y proteína fue determinado de acuerdo a la metodología establecida por la *Association of Analytical Communities* (AOAC) [8]. La determinación de humedad se realizó en una balanza de humedad Mettler Toledo HB43 Halogen, colocando 0.75 g de muestra en el equipo. La medición de las cenizas se realizó mediante el secado previo de las muestras a 75 °C, luego se incineraron a 550 °C durante 2 horas. El valor del nitrógeno total fue obtenido utilizando el protocolo “ASN_3438 Kjeldahl *nitrogen in molasses*” (AOAC 969.37). Como titulante se utilizó ácido clorhídrico estandarizado (HCl) 0.01 N. Para la determinación de los grados *Brix*, se utilizó el índice de refracción utilizando un refractómetro digital Atago con un rango de 45-93 %.

2.3 Transformación bacteriana

Se transformaron 220 µL de la bacteria *E. coli* K12 competentes (cortesía de INDICASAT) añadiéndole 2 µL del plásmido que contiene la secuencia de ADN del *biobrick* BBa_K590025 en el backbone pSB1C3 con resistencia al *cloranfenicol* (Kit de iGEM Spring 2012 DNA Distribution) utilizando el protocolo de transformación facilitado por el iGEM HQ en su página de soporte: *Registry of Standard Biological Parts, Transformation Protocols* [9].

2.4 Selección celular.

Se realizó en 2 placas Petri con agar LB al que se le agregó cloranfenicol con una concentración final de 25 µg/mL. De esta forma solo las células exitosamente transformadas tenían la capacidad de crecer en la placa. En una de las placas se sembró 20 µL de cultivo obtenido de la transformación para calcular el rendimiento de la misma.

2.5 Producción y extracción de alcanos biológicos

Medio de producción de alcanos. Se hizo una siembra de las bacterias transformadas con el plásmido de interés en medio LB con antibiótico de un día para otro (*overnight*), al día siguiente, por centrifugación y decantado se obtuvo un *pellet* de bacterias que se resuspendió en el medio de cultivo M9 modificado (con la melaza como única fuente de carbono), se dejaron crecer las bacterias en este medio

durante 48 horas y luego se hizo la extracción de los alcanos con Acetato de Etilo, se centrifugó, se tomó la capa superior de la centrifugación (que es el Acetato de Etilo con los alcanos disueltos en el) y se hizo el análisis de este extracto en el cromatógrafo de gases.

2.6 Determinación de alcanos por GC-MS

Los alcanos extraídos se analizaron mediante GC-MS para determinar su producción efectiva y consecuente identificación. Se utilizó un cromatógrafo de gases – espectrometría de masas (GC-MS) Agilent 6890N, equipado con un detector selectivo de masa (MSD) 5975C inerte con detector de triple eje (Agilent Technologie, Palo Alto, CA, USA). La separación se llevó a cabo en una columna capilar DB5-MS (30 m longitud, 0,25 mm d.i., 0,25 espesor de la película, Agilent Technologie, Palo Alto, CA, USA). El horno de cromatografía de gases tenía una temperatura inicial de 50 °C durante 2 min, luego se incrementó a 240 °C a una tasa de 6 °C / min mantenida por 5 min. La temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C, usando modo *splitless injection*. El gas transportador utilizado fue el Helio, con un flujo de 1 mL / min. El espectrómetro de masa estuvo funcionando en el modo *scan* desde 30-550 m / z, la temperatura de fuente de ion se estableció a 250 °C, la ionización se llevó a cabo en el modo *impact ionization* (EI) con el voltaje de ionización establecido en 70 e V.

3. Resultados y discusión

Luego de haber realizado los ensayos pertinentes se obtuvieron los siguientes resultados:

3.1 Melaza caracterizada

Los resultados obtenidos de los análisis fisicoquímicos realizados para la caracterización de la melaza utilizada se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1. Porcentaje de humedad, ceniza, proteína y grados Brix en melaza

Muestra	Humedad	Cenizas	Proteína	°Brix
Melaza	16.9 ± 0.6	13.6±0.9	2.49 ± 0.14	82.3±0.3

*Los valores corresponden al promedio ± DE

En Vega-Baudrit et al. (2007) respecto a la caracterización de melazas usadas en la síntesis de espumas de poliuretano (ver tabla 2), se reportan valores

similares a los que fueron obtenidos en este trabajo. Los componentes principales de la melaza son los carbohidratos y el contenido acuoso.

Tabla 2. Composición de melaza [10]

Componente	Composición (%)
Agua	20
Sacarosa	35
Glucosa	7
Cenizas	12
Compuesto nitrogenados	4.5

Fuente: Vega-Baudrit et al. (2007)

La medición del contenido de azúcares por grados Brix representa la cantidad de sólidos disueltos expresados como sacarosa. En el trabajo de Vega-Braduit et al. [10], obtuvieron un valor de 79.3°Bx.

3.2 Rendimiento de la transformación bacteriana

El rendimiento de la transformación fue de $7,6 \times 10^5 \text{ ufc} / \mu\text{g}$ valor que se calculó, primero, buscando el valor de las unidades formadoras de colonias (UFC) transformadas, valor que se obtuvo de la siguiente manera:

$$\text{UFC transf} = \frac{(14)(50)(1000)}{20} \quad (1)$$

En donde 14 corresponde al número de colonias obtenidas luego de 24 hr, 50 es el volumen de células competentes que se usó para la transformación (está en μL), 1000 es el factor de dilución obtenido al agregar 200 μL de medio LB; y 20 es el volumen de medio que se utilizó en la placa (también en μL). Luego de esto se determina la eficiencia de transformación como sigue:

$$\text{Ef. de transf.} = \frac{3,5 \times 10^4 \text{ ufc}}{0,046 \mu\text{g}} = 7,6 \times 10^5 \text{ ufc} / \mu\text{g} \quad (2)$$

El valor de $3,5 \times 10^4 \text{ ufc}$ son las ufc's transformadas que se obtuvieron, y 0,046 μg fue la cantidad de plásmido empleado para la transformación (1 μL con una concentración de $4,6 \times 10^{-2} \mu\text{g} / \mu\text{L}$ de plásmido Bba_K490025). Como plásmido de control se utilizó el Bba_J04450 (plásmido que le otorga una fluorescencia roja a las colonias transformadas), cuya eficiencia fue de $2,57 \times 10^5 \text{ ufc} / \mu\text{g}$.

3.3 Alcanos determinados por GC-MS

Como se observa en la tabla 3, los principales alcanos identificados fueron undecano, tetradecano, pentadecano y hexadecano, pero además también se pudieron identificar otros hidrocarburos de cadena corta como el octano. En los trabajos realizados como parte del proyecto de la Universidad de Washington para el *International Genetically Engineered Machines* del 2011 [11], obtuvieron alcanos de cadenas C13, C15 y C17 utilizando el medio M9 con glucosa como fuente de carbono; mientras que en el trabajo de Schirmer et al. (2010) [5] fue demostrada la producción de tridecano (C13), pentadecano (C15) y heptadecano (C17) en *E.coli* a través de la expresión de los genes *aar* y *adc*.

Tabla 3. Tiempos de retención observados en el cromatograma para los picos identificados

	Tiempo de retención	Deconvolución	Porcentaje (%)
Octano	4.036	4.65	0.06
Undecano	17.662	18.51	0.03
Tetradecano	41.268	20.43	0.06
Pentadecano	45.525	22.84	0.07
Hexadecano	49.366	25.27	0.03

En la figura 3 se muestra el cromatograma obtenido de hidrocarburos extraídos con acetato de etilo de una muestra del medio M9 con melaza luego de 48 h de incubación con las bacterias modificadas.

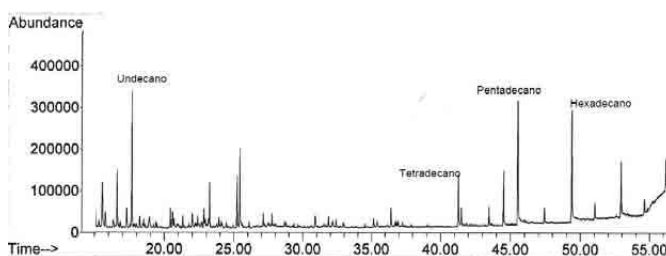


Figura 3. Picos señalados en el cromatograma obtenido del análisis de la extracción con acetato de etilo de una muestra de medio M9 con melaza.

4. Conclusiones

En esta investigación se pudo corroborar que la *E.coli* transformada puede utilizar la melaza como fuente de carbono y producir hidrocarburos entre 11 y 15 carbonos. Queda por determinar el grado o la eficiencia de producción. Se esperaba que fueran alcanos de cadena

larga, que pudieran ser utilizados como biocombustibles, y como se observó, sí fue posible.

Utilizando la biología sintética, se puede no solo obtener biocombustibles, sino también nuevas moléculas, las bacterias podrán inclusive sustituir procesos de la industria química que son agresivos para el medio ambiente. Esto es una solución factible al problema de contaminación ambiental.

5. Agradecimiento

Se agradece al Dr. Javier Sánchez-Galán por su invaluable apoyo; al Centro de Producción e Investigaciones Agroindustriales (CEPIA) y al grupo de investigaciones en biotecnología, bioinformática y biología de sistemas (GIBBS) por la gestación y apoyo en la ejecución de este proyecto.

A su vez, a los investigadores y laboratorios del Instituto de Investigaciones Científicas y de Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT AIP).

El presente trabajo de investigación fue financiado bajo el programa UTP Investiga, de la Universidad Tecnológica de Panamá.

6. Referencias

- [1] S. Saval. Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *Biotecnología*, vol. 16, pp. 14-46, 2012.
- [2] Producción de azúcar y melaza y caña utilizada en la República: Años 2011 y 2012. Instituto General de Estadística y Censo (INEC). Contraloría General de la República de Panamá.
- [3] M. Schmidt. *Synthetic Biology: Industrial and Environmental Applications* (3rd ed.). Weinheim, Germany: Wiley-Blackwell. pp. 1-67, 2012.
- [4] L. Serrano. Synthetic biology: promises and challenges. *Molecular Systems Biology*, vol 6. pp 1-5, 2007.
- [5] A. Schirmer, M. Rude, X. Li, E. Popova, S. Del Cardayre. Microbial Biosynthesis of Alkanes. *Science*, vol. 329, pp. 559-562, 2010.
- [6] UW iGEM Make it or break it. Diesel Production: Methods. Dirección web: <http://2011.igem.org/Team:Washington/Alkanes/Methods>
- [7] REGISTRY OF STANDARD BIOLOGICAL PARTS. PART: BBa_K590025 designed by Lei Sheng, Group iGEM11_Washington (2011-9-15). Website http://parts.igem.org/Part:BBa_K590025?title=Part:BBa_K590025. Página de información. Consultado: Septiembre 10, 2014.
- [8] AOAC Official Methods of Analyses. Washington, DC: s.n. 1997.
- [9] Transformation protocol. Registry of standard biological parts. I-Gem. Webpage: http://parts.igem.org/Help:Transformation_Protocol
- [10] J. Vega-Baudrit, K. Delgado-Montero, M. Sibaja-Ballesteros, P. Alvarado-Aguilar. Uso alternativo de la melaza de la caña de azúcar residual para la síntesis de espuma rígida de poliuretano (erp) de uso industrial. *Tecnología, Ciencia, Educación*, vol. 22. pp. 101-107, 2007.
- [11] UW iGEM Make it or break it. Diesel Production: Results Summary. Dirección web: <http://2011.igem.org/Team:Washington/Alkanes/Results>