

Producción de solventes de alto valor agregado por cepas nativas de *Clostridium* spp

High added-value solvent production by native *Clostridium* spp strains

*Dolly Montoya C.*¹

Recibido: mayo 9 de 2008

Aprobado: mayo 21 de 2008

En septiembre de 1982 el Grupo de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, inició actividades preliminares para la creación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Después de un diagnóstico de Biotecnología en Colombia, se establecieron 3 áreas de investigación y se trazó una estrategia para la consecución de recursos nacionales y de cooperación internacional. En el marco del Programa “Segunda Expedición Botánica” de Colciencias, se logró apoyo para los proyectos de las áreas definidas y el área de investigación en “Producción de materias primas por fermentación”, dio origen, al Grupo de Bioprocesos y Bioprospección, creado en 1996.

Nuestro Grupo entiende la bioprospección como la búsqueda sistemática en la biodiversidad de nuevas fuentes de compuestos, genes, enzimas, proteínas, biopolímeros, entre otros, con el propósito de explorar su potencial biotecnológico y generar de manera sustentable nuevos productos y servicios que retribuyan en bienestar social y crecimiento económico de nuestro País. Nuestro grupo posee cuatro líneas de investigación: Biopolímeros, caucho natural, biofertilizantes y microorganismos solventogénicos. A continuación presentaremos solamente la línea de microorganismos solventogénicos.

La línea de microorganismos solventogénicos del Grupo de Bioprocesos se inició con la construcción de un cepario, la evaluación de diferentes tipos de fermentación y la estandarización de las condiciones de aislamiento y cultivo de microorganismos anaerobios mediante el uso de cepas de referencia (*Clostridium ace-*

1 MS c. Ph. D. Directora del Grupo de Bioprocesos y Bioprospección IBUN, Línea de microorganismos solventogénicos.





tobutylicum ATCC). A mediados de los ochenta se colectaron 155 muestras de suelos de diferentes nichos ecológicos a través del territorio colombiano. De estas muestras se obtuvieron 178 aislamientos del género *Clostridium*, trece de ellos produjeron solventes de interés comercial (acetona, butanol, etanol y 1,3-Propanodiol) en mayor concentración que las cepas de referencia *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. acetobutylicum* DSM 792, *C. beijerinckii* NCIMB 8052 y *C. butyricum* DSM 2478. La capacidad de estas cepas promisorias para utilizar como sustrato, diferentes tipos de polisacáridos fue evaluada igualmente, obteniéndose resultados alentadores con los sustratos celulósicos y hemicelulósicos CMC, Xilano, Arabinano, Pectina, Avicel y Celobiosa (Montoya *et al.*, 1999).

A las trece cepas promisorias se les ha hecho estudios taxonómicos por medio de ensayos bioquímicos y moleculares que han sido estandarizados en el laboratorio de microbiología del IBUN. Los ensayos moleculares implementados incluyen AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), perfiles plasmídicos, secuenciación total del gen 16S rARN, PFGE (electroforesis en gel de campo pulsado), hibridación ADN-ADN, y perfiles de macrorrestricción. Un análisis multivariado reciente analizó los resultados de dichos ensayos y concluyó que diez de las trece cepas promisorias pueden formar una nueva especie dentro del género *Clostridium*. (Suárez *et al.*, 2004)..

En la búsqueda de la exploración biotecnológica se establecieron dos estrategias, una para producir butanol acetona de residuos agroindustriales y la otra, la producción de 1,3 PD a partir de glicerina generada en el proceso de producción de biodiesel.

La primera estrategia se desarrolló con efluentes de industrias vegetales, como es el caso de POME (efluente del proceso de extracción de aceite de palma africana con alto contenido de polímeros de celulosa y hemicelulosa), para producir butanol y acetona (Montoya, 2003). La cepa IBUN 22 A presentó la mas alta capacidad de hidrólisis de polímeros de celulosa. Para incrementar la actividad hidrolítica se construyó una librería genómica en búsqueda de genes que codificaran para la producción de glucanasas y se analizaron secuencias de clones de mayor tamaño (mayores a 500 bp). Esta cepa (IBUN 22A) también fue sometida a transformación con un plásmido metilado que expresa una endoglucanasa, y se encontró que el plásmido era estable por más de 100 generaciones en condiciones controladas en el laboratorio, mientras que su actividad β -glucanasa se incrementó en 5000 veces, sin embargo, cuando se trabajó en mayor escala, se segregó el plásmido.

La segunda estrategia fue producir 1,3 Propanodiol a partir de glicerol obtenido del proceso de producción de biodiesel. El 1,3-Propanodiol (1,3-PD) es un compuesto versátil para la síntesis de heterociclos, lubricante, solvente y monómero para la producción de polímeros tipo poliésteres y poliuretanos (Bories *et al.*, 1998; Liu, 2000). Se sintetiza tradicionalmente por vías químicas tales como la hidrólisis de la acroleína y la reacción de óxido de etileno con monóxido de carbono e hidrógeno (Deckwer *et al.*, 1999). Sin embargo, estos procesos son costosos, tóxicos para la industria y generan rendimientos inferiores al 43% (Barbirato *et al.*, 1999). El reciente desarrollo de los polímeros polimetilentereftalatos (PTT) sintetizados a partir de 1,3-PD y ácido tereftálico ha impulsado el estudio de la conversión de glicerol a 1,3-PD por diferentes especies de bacterias, entre las que se encuentran *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* y *Clostridium butyricum*.



Para producir por vía biotecnológica 1,3-Propanodiol de manera competitiva, se requiere tanto de cepas de alto rendimiento, como de sustratos económicos (glicerina industrial procedente de la industria del biodiesel), lo cual ha motivado la búsqueda de cepas nativas promisorias capaces de emplear estos subproductos con alto contenido de glicerol como fuentes de carbono para la fermentación (Deckwer, 1999; Vasconcelos *et ál.*, 2004; Zeng *et ál.*, 2002). Empleando como fuente de carbono glicerol, se evaluó la capacidad de las trece cepas promisorias para producir 1,3-PD, y se encontró que cinco de ellas poseen una productividad volumétrica mayor a la de las cepas de referencia *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. kaimantoi* DSM 523 y *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (Cárdenas *et ál.*, 2004). Por medio del análisis de secuencias obtenidas de la librería genómica de la cepa nativa IBUN 22A, se localizó en el clon pBS22A-Br4 una secuencia de 382 nucleótidos que comparte el 98% de identidad con el gen *dbaB1* de *C. butyricum*, el cual codifica para la enzima glicerol deshidratasa (primera en la bioconversión de glicerol en 1,3-PD). Dada la alta similitud que presentan las cepas IBUN 22A e IBUN 13A tanto en la secuencia del gen 16S rARN (mayor a 99,5%), como en los perfiles de macrorrestricción, se esperaba que la IBUN 13A tuviese también un gen de glicerol deshidratasa similar al de *C. butyricum*, que no requiere vitamina B12, para la producción del metabolito reduciendo notablemente los costos de producción.

Se obtuvo la organización física en el operón *dba*, encargado de la regulación genética de la producción del solvente 1, 3-Propanodiol, en dos de las cepas nativas (IBUN 158B e IBUN 13A) que degradan glicerol y producen 1,3-PD. Estas cepas que están estrechamente relacionadas con *Clostridium butyricum*, y presentan una organización de genes muy similar a la reportada para las cepas *Clostridium buyiricum* VPI 1718 (hiperproductora del solvente), y *Clostridium buyiricum* DSM 2478 (cepa patrón). En el momento se está trabajando en la mejor comprensión de la bioquímica, genética, proteómica y metabolómica del proceso biológico, para generar impacto en el sector productivo a través de un bionegocio exitoso.

La línea de investigación en microorganismos solventogénicos está dirigida por la profesora Dolly Montoya Castaño, y participan en ella, los investigadores, Óscar Aragón C., Mauricio Bernal M., Ximena Pérez M. y José David Montoya S.

Referencias bibliográficas

- Artusso, A. 2002. Bioprospecting, Benefit Sharing, and Biotechnological Capacity Building. *World Development* 30 (8): 1355-1368.
- Montoya, D.; Sierra, J.; Silva, E.; Buitrago, G.; Ramos, J. 1999. Optimización de un medio de cultivo industrial para la fermentación acetobutilica. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2: 37.
- Montoya, D. 2003. Anaerobic, solvent-producing bacteria: molecular characterisation, polysaccharolytic activity and agroindustrial waste degradation. Tesis de doctorado para optar al título de Dr. Rer. Nat. Universidad Técnica de Munich, Alemania.
- Suárez, Z.; Chávez, B.; Aristizábal, F.; Montoya, D. 2004. Contribución a la caracterización de cepas nativas de *Clostridium* mediante análisis multivariado de características fenotípicas y genotípicas. Memorias del XIV Simposio Nacional de Estadística. Cartagena de Indias, Colombia.



- Cárdenas, D.; Pulido, C.; Aragón, O.; Aristizábal, F.; Suárez, Z.; Montoya, D. 2006. Evaluación de la producción de 1,3-propanodiol por cepas nativas de *Clostridium* sp. mediante fermentación a partir de glicerol USP y glicerol industrial subproducto de la producción de biodiésel. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas* 35 (1): 120-137.
- Barbirato, F.; Hassan, E. H.; Conte, T.; Bories, A. 1998. 1,3-Propanodiol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. *Industrial Crops and Products* 7: 281.
- Biebl, H.; Menzel, K.; Zeng, A. P.; Deckwer, W. D. 1999. Microbial production of 1,3-Propanodiol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52: 289.
- Himmi, E. H.; Bories, A.; Barbirato, F. 1999. Nutrient requirements for glycerol conversion to 1, 3 Propanodiol by *Clostridium butyricum*, *Bioresource Technology* 123-128.
- Liu, Y. 2000. New biodegradable Polymers from renewable resources. Department of polymer Technology. Royal Institute of Technology (KTH). Sweeden, 3.
- González-Pajuelo, M.; Andrade, J. C.; Vasconcelos, J. J. 2004. Production of 1,3-Propanodiol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 31: 442.
- Zeng, A. P.; Biebl, H. 2002. Bulk Chemicals from Biotechnology: The Case of 1,3 Propanodiol production and the New Trends. *Advances in Biochemical Engineering* 74: 240.