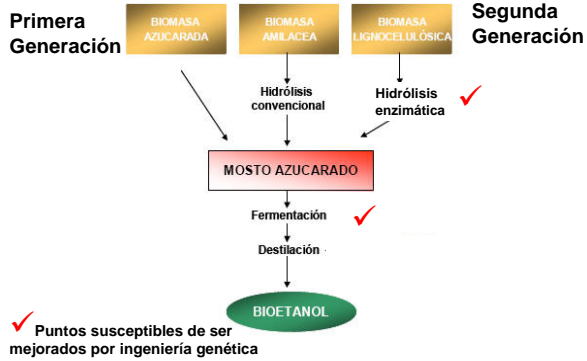


Contribuciones de la ingeniería genética a la producción de bioetanol

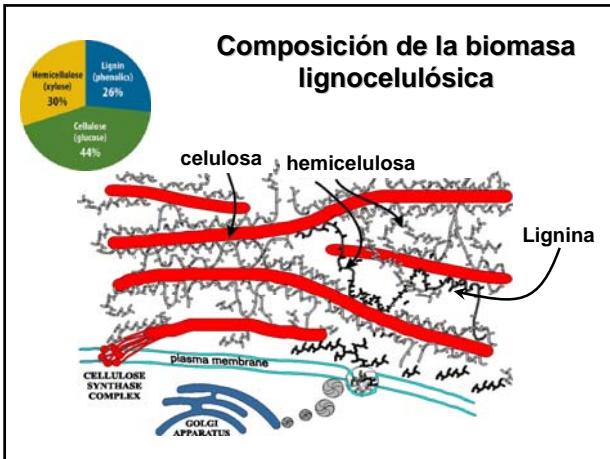
Oriana Salazar
Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología
26 de Agosto 2010

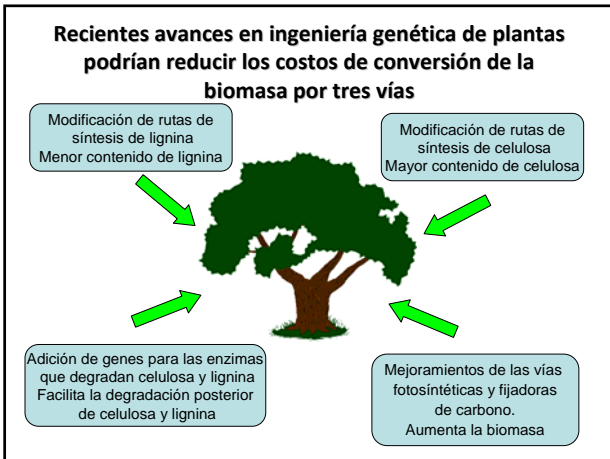
Bioetanol

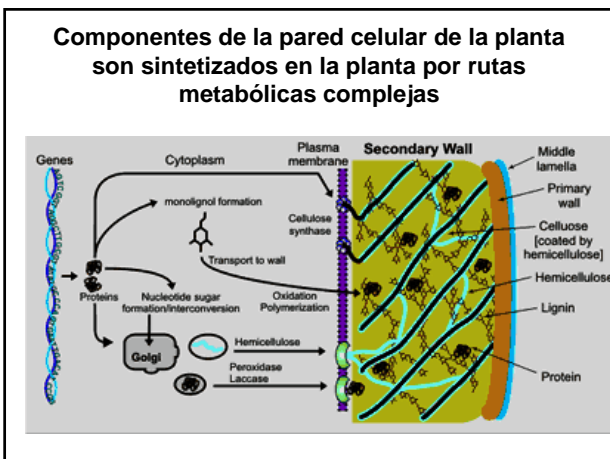


Análisis económico de la producción de bioetanol celulósico

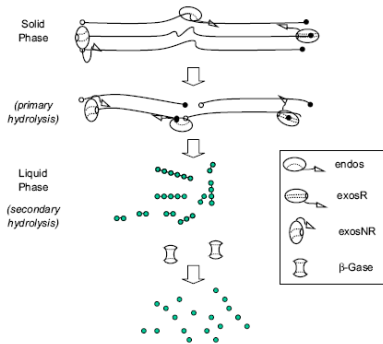
- 15 años atrás el costo de la producción de etanol desde celulosa era US\$4.0 por galón.
- Hoy en día, este costo ha bajado a US \$ 1.8 por galón como resultado del esfuerzo de la investigación científica
- Se proyecta un costo de US \$ 0.20 por galón en 2015 si se reduce el costo del procesamiento de la biomasa y el costo de las enzimas celulasas







Hidrólisis de celulosa: sacarificación



Los costos de producción de celulosa pueden reducirse mediante las siguientes estrategias:

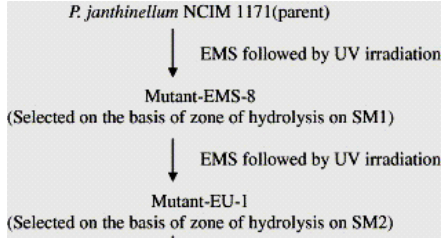
1. Mejoramiento genético de los microorganismos productores (hongos/bacterias)
2. Aislado nuevos microorganismos superproductores de celulasas
3. Mejorando los sistemas de cultivo (ej. Sistema fed-batch)
4. Fermentación en estado sólido

Mejoramiento genético de los hongos/bacterias productores

- ✓ Mutagénesis.
- ✓ Tecnología de fusión de protoplastos
- ✓ Ingeniería genética y técnicas de DNA recombinante

Mejoramiento de *Penicillium janthinellum* por mutagénesis para aumentar la producción de celulasa

Protocolo seguido



EMS: etil metil sulfonato Adsul et al, Bioresource Technology 98 (2007) 1467–1473.

Hidrólisis de celulosa microcristalina por *Penicillium janthinellum*

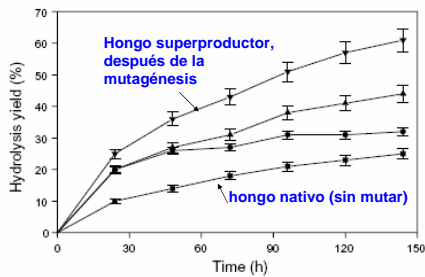
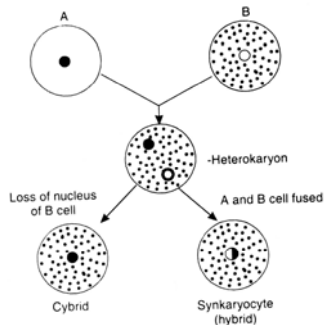


Fig. 2. The hydrolysis of Avicel (5%) using enzyme preparations of Parent (■), EMS-UV-8 (●), EU2D-21 (▲), EU1 (▼).

Mutagénesis de *Trichoderma reesei*

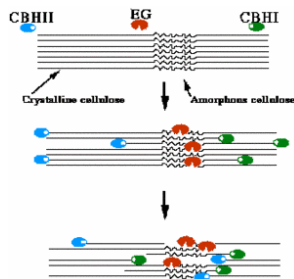
Production Strain	Strain	Yield gm E/ gm C	Productivity gm E/ L/hr
NTG ↓ Screen 1	Production Strain	100 %	100 %
Mutant 1	Mutant 1	132 %	119 %
NTG ↓ Screen 2	Mutant 2	136 %	119 %
Mutant 2	41G	146 %	125 %
NTG ↓ Screen 3			
41G			

Fusión de protoplastos



Resultados de la tecnología de fusión de protoplastos

- *T. reesei* produce endoglucanasa y exoglucanasa
- *A. niger* produce β -glucosidasa.
- La fusión de protoplastos de estos hongos generó un hongo híbrido que produjo las tres enzimas



Estrategias para mejorar los microorganismos productores de celulasas

- La tecnología del DNA recombinante ofrece la posibilidad de fusionar diferentes genes de enzimas que hidrolizan lignocelulosa o secciones de genes de diferentes organismos para generar una enzima nueva, híbrida, con propiedades mejoradas.
- Aumentar el número de copias de los genes de endoglucanasa y exoglucanasa en un microorganismo en particular

Mejoramientos a nivel de la producción de etanol (fermentación)

- Por ingeniería metabólica
- Por ingeniería genética

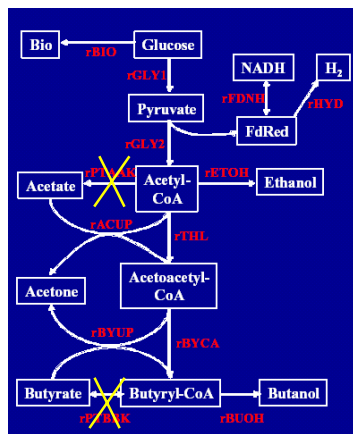
Producción de solventes en *Clostridium acetobutylicum*

Ing Metabólica para eliminar las vías

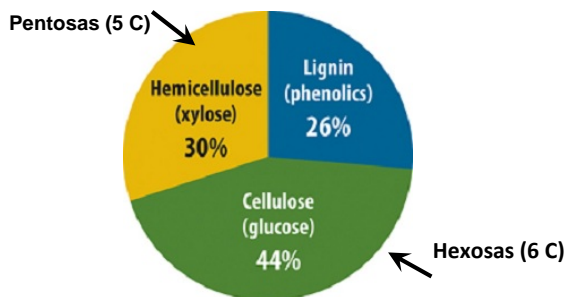
- AcetilCoA---Acetato
- ButirilCoA---Butirato

Aumentar la producción de etanol y butanol

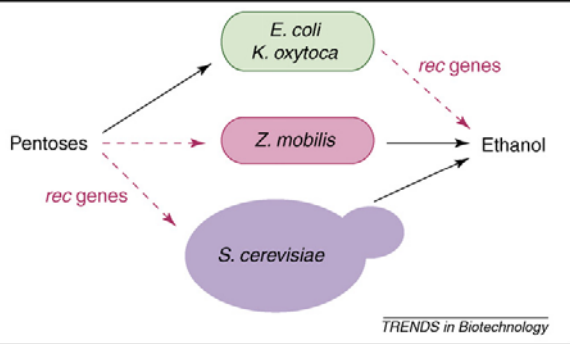
Inactivación de genes cromosomales por recombinación homóloga



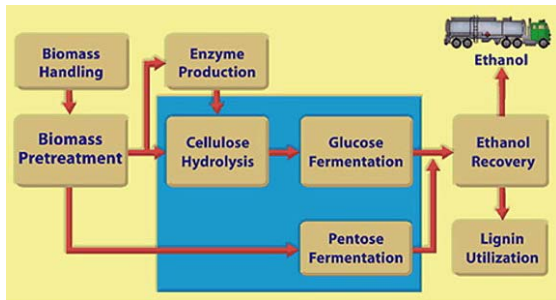
Lignocelulosa compuesta de azúcares de 5 y 6 carbonos



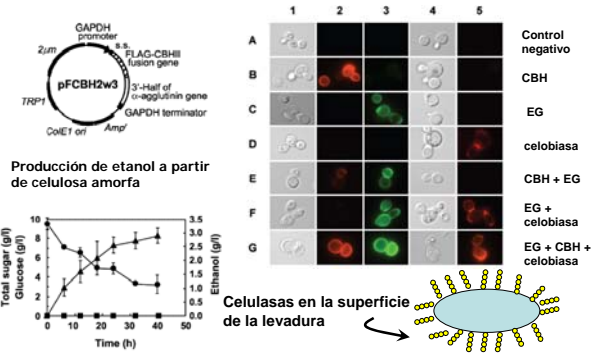
¿Cómo generar m.o. que fermenten pentosas a etanol?



Proceso de producción de bioetanol a partir de celulosa



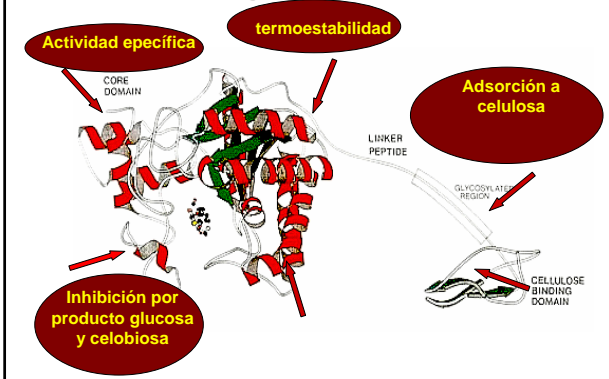
Modificación genética de *S. cerevisiae* para la producción de celulasas



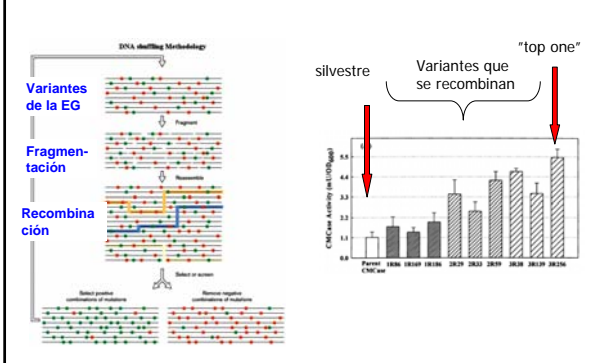
Enzyme engineering

- Enzyme engineering opens up numerous possibilities for designer enzymes with various engineered properties.
- The active carboxylic residues in *T.reesei* endoglucanase identified by site direct mutagenesis opening up future research prospects for modifying those to improved activity.
- A number of designer enzymes also called glucosynthases including cellulase and hemicellulase have been engineered by replacing the nucleophilic residue thus resulting in higher yields of different oligosaccharides.

Celulasas: potencial de mejoramiento



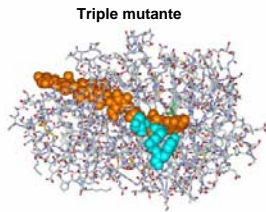
Identificación de una endoglucanasa mas activa por DNA shuffling



Mutagénesis racional de exoglucanasa de *Trichoderma*



Divne et al., 1998. J. Mol. Biol. 274, 309-325.



Triple mutante

T246A/R251A/Y252A

Exoglucanasa mutada es mas activa en conversión de celulosa a glucosa

