



## PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE BIOMASA POR *Escherichia coli* MS04 COMPLEMENTADA CON UN FRAGMENTO DE ADN METAGENÓMICO

Inés Loaces<sup>1</sup>, Vanesa Amarelle<sup>1</sup>, Iván Muñoz-Gutiérrez<sup>2</sup>, Alfredo Martínez<sup>2</sup> & Francisco Noya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas, Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable", CP. 11600, Montevideo, Uruguay. <sup>2</sup> Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P: 510-3. Cuernavaca, Morelos, 62270 México. iloaces@iibce.edu.uy

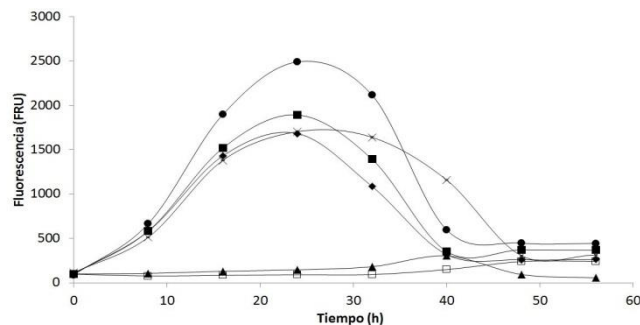
*Palabras clave: Metagenómica, bioetanol, hidrólisis de biomasa.*

**Introducción.** La lignocelulosa es una materia prima prometedora para la producción de biocombustibles como el etanol. La conversión implica tres grandes pasos: pretratamiento, sacarificación y fermentación de azúcares liberados. Hoy en día, las enzimas involucradas en la sacarificación tienen que ser agregadas al proceso y por lo general son suministradas por un proveedor externo. El bio-proceso consolidado (CBP) es un esquema ideal en el que, un microorganismo es capaz de producir estas enzimas y fermentar los azúcares en el mismo reactor. Utilizando metagenómica funcional se tiene acceso a nuevas enzimas provenientes de una amplia variedad de microorganismos, las cuales pueden contribuir a la optimización y reducción de los insumos requeridos por las tecnologías actuales de producción.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de la cepa etanológica de *E. coli* MS04 (1), complementada con un fósido metagenómico con actividad celulolítica, en el proceso de fermentación de biomasa celulósica.

**Metodología.** A partir de fluido ruminal bovino se construyó una metagenoteca de fósidos la cual se evaluó en medio rico suplementado con carboximetilcelulosa (CMC) para detectar clones con actividad celulolítica. Se seleccionó un clon, se profundizó en su caracterización fenotípica y fue secuenciado. Este fósido fue transferido a la cepa MS04 y se realizaron ensayos de fermentación (2) en medio mineral utilizando CMC como fuente de carbono. Se evaluó el efecto de adicionar  $\beta$ -glucosidasa (BglC) (3) y de glucosa.

**Resultados.** De 30.000 clones obtenidos, 45 mostraron actividad positiva en placas, mientras que 5 tuvieron actividad 4-MUCasa en extractos celulares. Uno de los clones, denominado Csd4, fue capaz de conferir a *E. coli* la habilidad de crecer en medio mínimo suplementado con avicel, xilano, papel de filtro o bagazo de caña como fuente de carbono. Ensayos adicionales mostraron que la actividad celulolítica es extracelular, máxima a las 24 horas y que es inhibida en presencia de glucosa o xilosa (Fig. 1). En el ADN (34,406 bp) de Csd4 fueron identificadas una endoglucanasa, una xylosidasa y una lacasa. Los análisis de comparación de secuencia mostraron que Csd4 deriva de un organismo relacionado a *Prevotella ruminicola* pero no se encontró homología con ninguno de los genomas actualmente anotados.



**Fig. 1.** Actividad celulolítica (4-MUCasa) de *E. coli* (Csd4) en medio rico suplementado con glucosa (□), xilosa (▲), celobiosita (■), CMC (×), avicel (●) o sin suplementar (♦). DO inicial 0.05. FRU: unidades relativas de fluorescencia. Experimentos realizados por triplicado.

El fósido Csd4 fue transferido a la cepa MS04. Se determinó que adicionar BglC tiene un efecto positivo en la utilización de CMC como fuente de carbono. Ensayos de fermentación mostraron que MS04 (Csd4) produce etanol a partir de CMC con un rendimiento del 56% del máximo teórico (Tabla 1). A su vez, se observó la producción de etanol a partir de avicel, papel de filtro y bagazo de caña.

**Tabla 1.** Producción de etanol en medio mínimo utilizando la cepa MS04 (Csd4) suplementado con BglC (10 U/g sustrato) Incubación a 37°C, 150 rpm, pH 7, 120 horas. 10 g/L de cada sustrato.

Cepa	Etanol (g/L)		
	Glucosa	CMC + Glucosa	CMC
MS04 (Csd4)	4,096 ± 0.007	5.276 ± 0.109	3.550 ± 0.150
MS04 (C-)	4.226 ± 0.149	4.141 ± 0.140	0.300 ± 0.154

**Conclusiones.** Csd4 confiere a *E. coli* la capacidad de crecer y producir etanol a partir de sustratos celulósicos. La complementación de MS04 (Csd4) con  $\beta$ -glucosidasa mejora la producción de etanol a partir de CMC.

**Agradecimiento.** Trabajo financiado por el proyecto #FSE\_2009\_23 (ANII, Uruguay) y por SRE, AMEXCID, México.

### Bibliografía.

- Fernandez-Sandoval M. T, Huerta-Beristain G, Trujillo-Martinez B, Bustos P, Gonzalez V, Bolivar F, Gosset G & Martinez A. (2012).. *Appl Microbiol Biotechnol* 96(5): 1291-1300.
- Muñoz-Gutiérrez I, Oropeza R, Gosset G & Martínez A. (2012). *J Ind Microbiol Biotechnol* 39(8): 1141-1152.
- Spiridonov N & Wilson D. (2001). *Current Microbiol* 42(4): 295-301.