

Ingeniería metabólica para la producción de biocombustibles isoprenoides

Proyecto FSE_1_2011_1_6068

Laura Camesasca¹, Manuel Minteguiaga^{1 2}, Laura Fariña^{1 3}, Eduardo Boido³, Eduardo Dellacassa², Pablo Aguilar⁴, Carina Gaggero¹

¹ Biología Molecular – IIBCE

² Química Orgánica – Facultad de Química

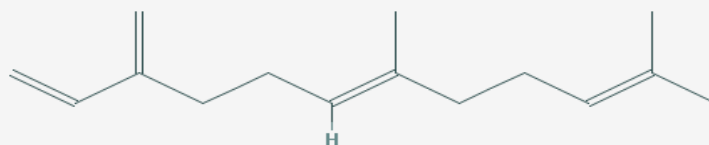
³ Enología – Facultad de Química

⁴ Biología Celular de Membranas - IPMon

Antecedentes en el mundo

- Isoprenoides de 10 carbonos (monoterpenos) o de 15 carbonos (sesquiterpenos) como biocombustibles alternativos producidos por microorganismos
- Amyris – Total

Farnesano como combustible para aviones. Se obtiene mediante expresión de una farnesene sintasa de plantas en *Saccharomyces cerevisiae* y posterior hidrogenación del farnesene:

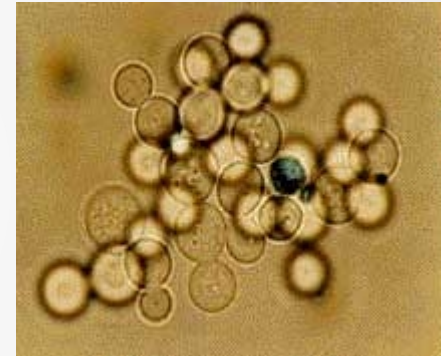


Antecedentes del grupo de trabajo

- En ausencia de genes o precursores vegetales, *Sacharomyces cerevisiae* es capaz de producir monoterpenos y sesquiterpenos. Coq1p podría estar involucrada en la producción de monoterpenos. (FEMS Microbiol. Lett. 243:107)
- *Saccharomyces cerevisiae* puede llegar a producir 400 mg/L de alcoholes superiores: suma de 2-methyl-1-propanol, 2-methyl-1-butanol y beta-phenylethyl alcohol. (FEMS Yeast Res. 8:1196)

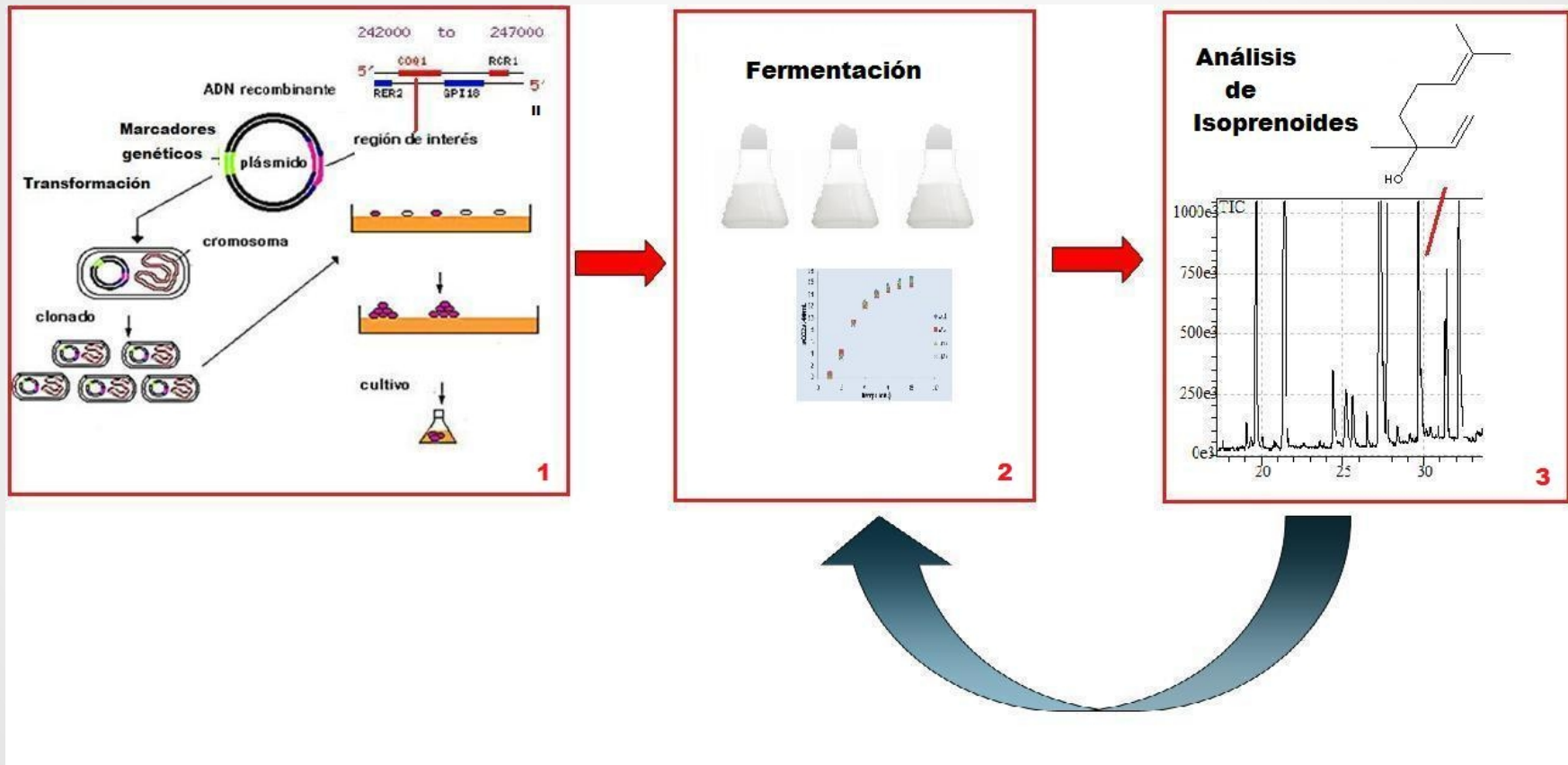
Objetivo general

- Modificar genéticamente a *Saccharomyces cerevisiae* para aumentar la producción de compuestos de naturaleza isoprenoide con propiedades biocombustibles
- **Objetivos específicos:**
- Sobre-expresar Coq1p
- Ensayar diferentes contextos genéticos
- Analizar compuestos isoprenoides y alcoholes superiores
- Preparar mezclas sintéticas y analizar sus propiedades combustibles en ANCAP

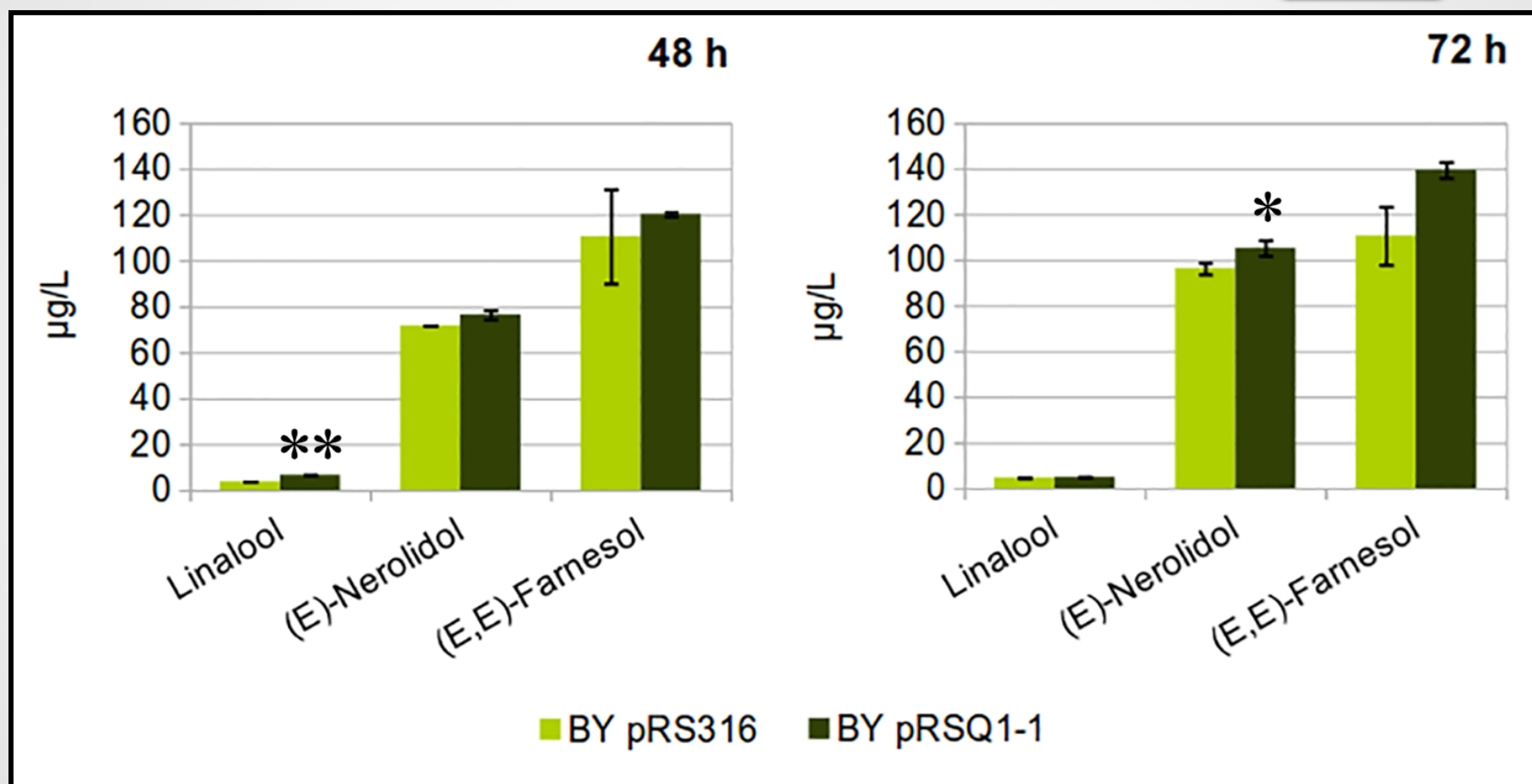


Estrategia experimental

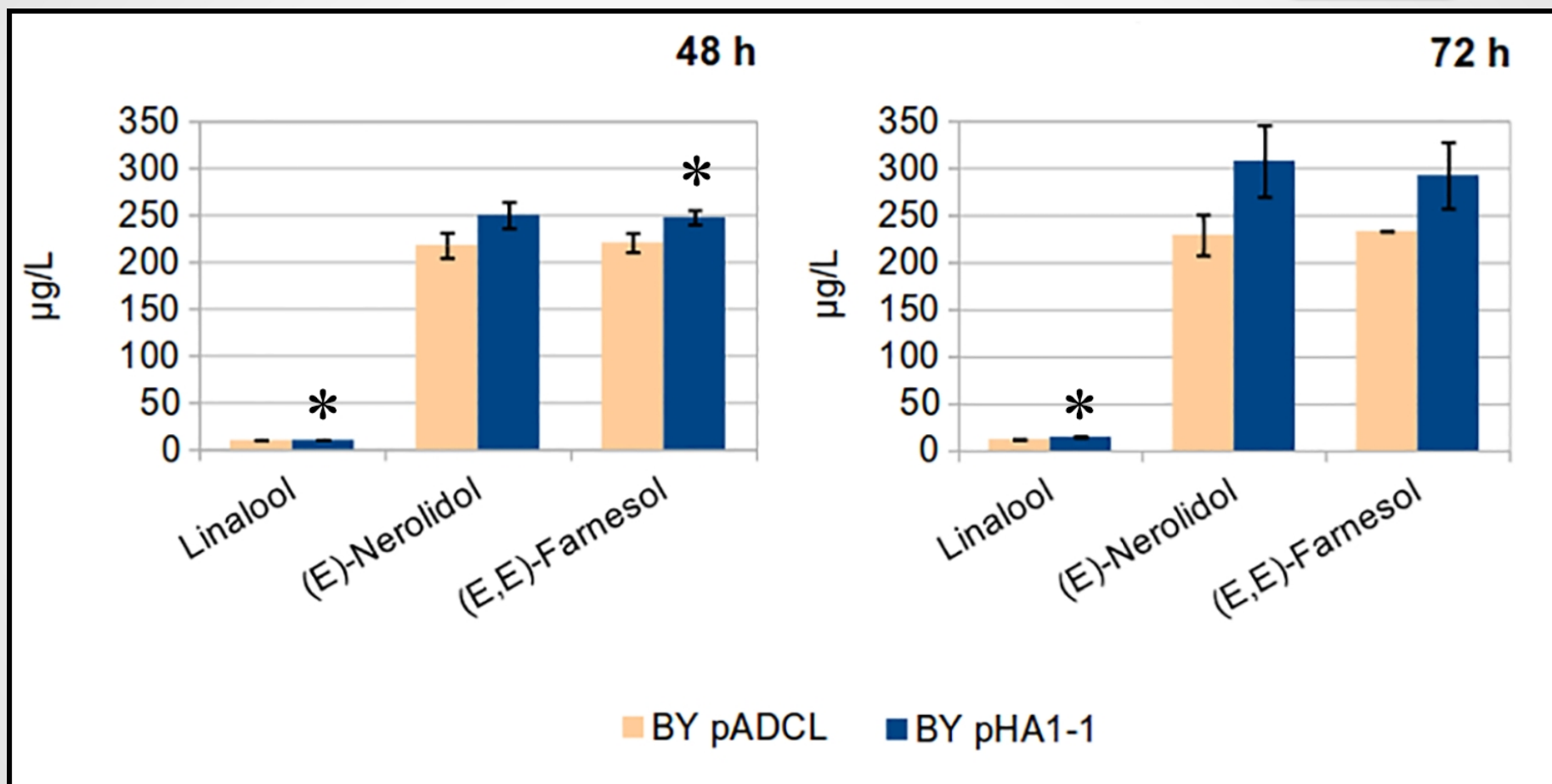
- Modificación genética de *S. cerevisiae*



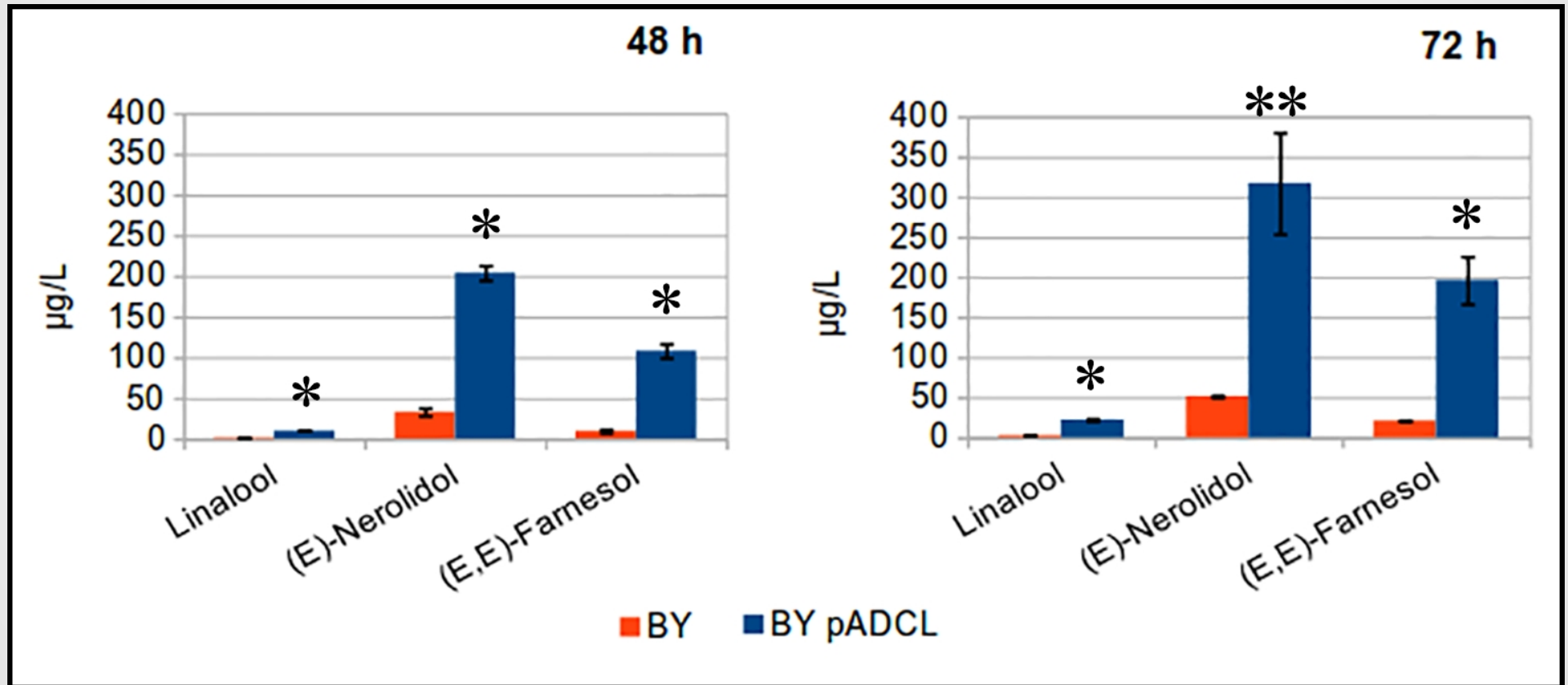
Sobre-expresión de Coq1p



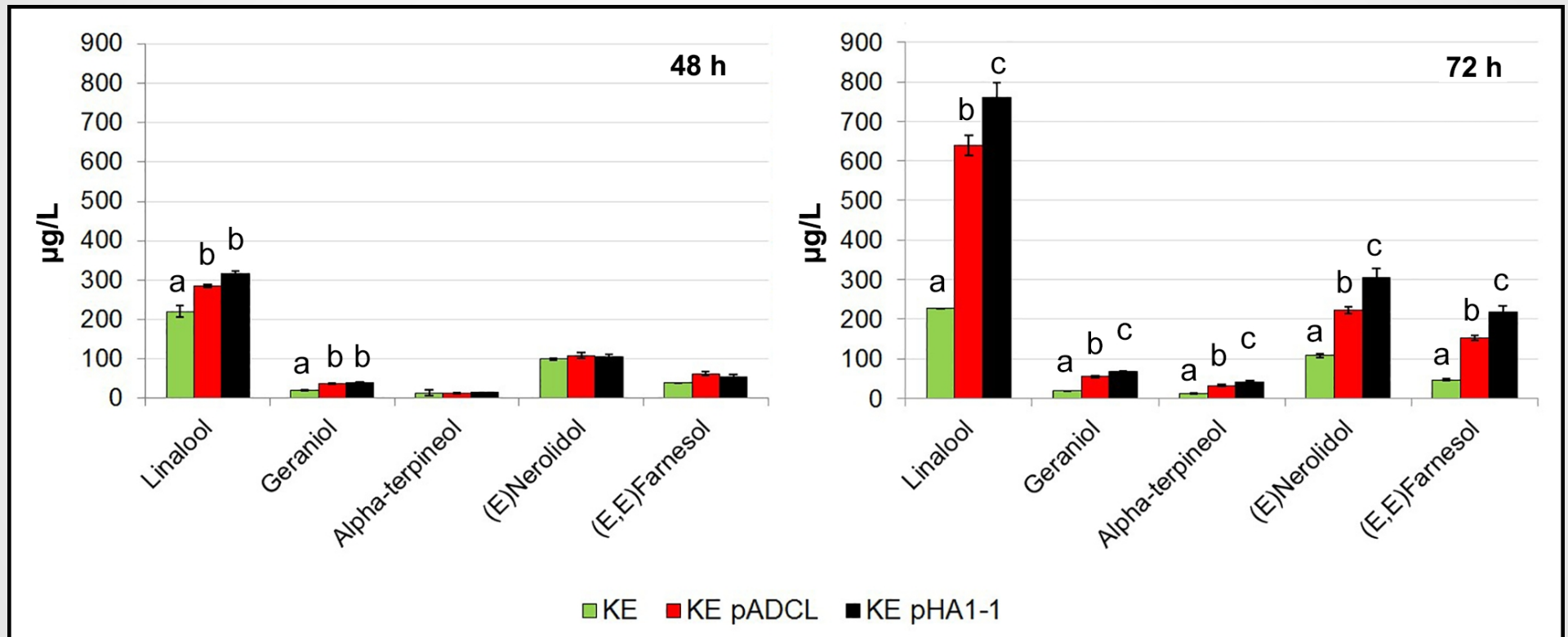
Sobre-expresión de Coq1p



Presencia de plásmido vacío aumenta niveles de isoprenoides

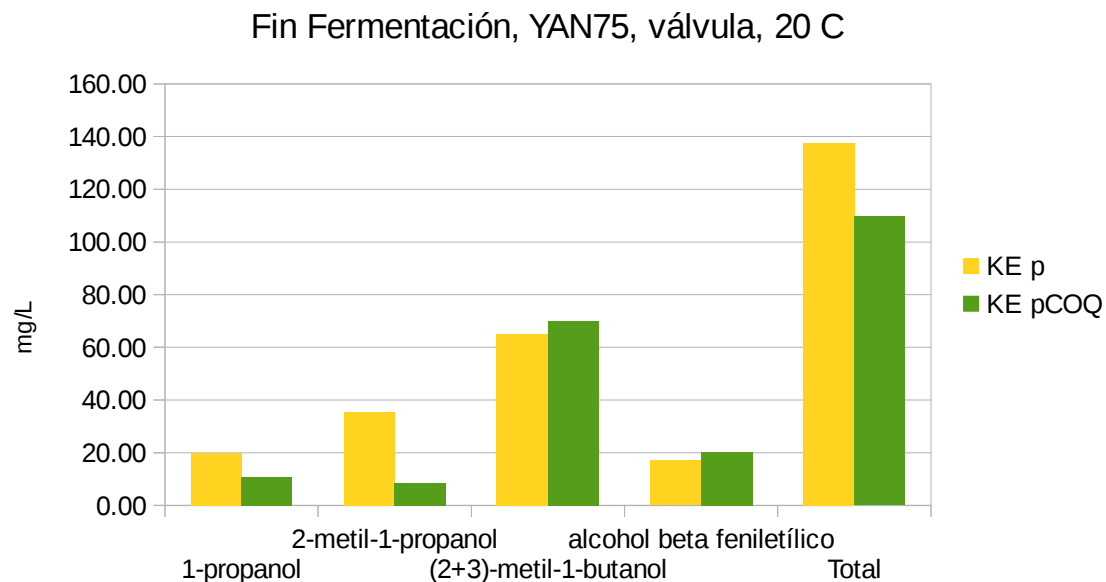


Altos niveles de isoprenoides en contexto genético K197E (*erg20*)

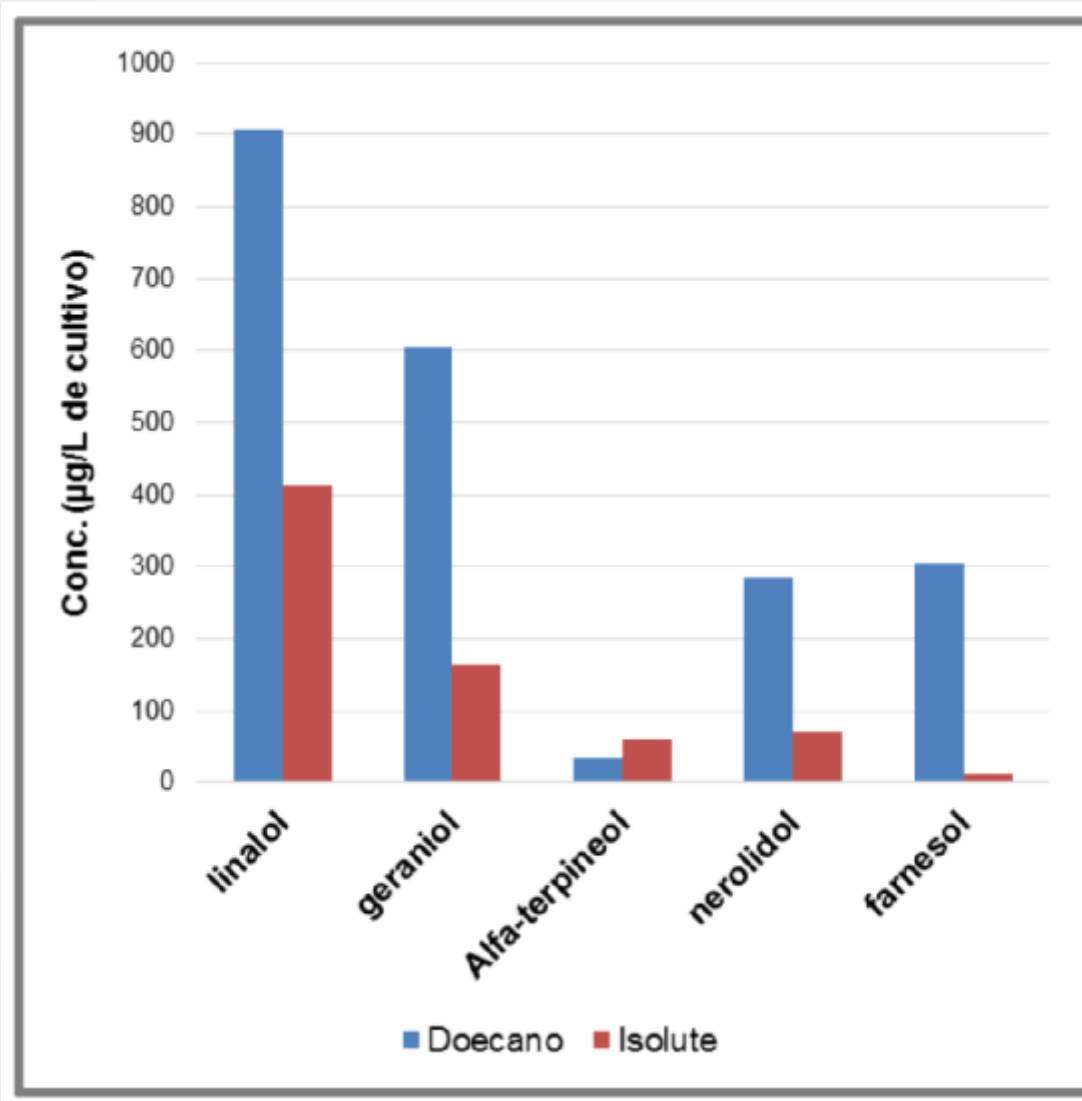


Alcoholes superiores

- Las altas concentraciones de isoprenoides totales (1.3 mg/L) se lograron luego de 72h de cultivo, YAN 200mgN/L
- Las altas concentraciones de alcoholes superiores se lograron a fin de fermentación, YAN 75mgN/L. Con cepas de laboratorio se obtuvieron menores concentraciones (140 mg/L) que con cepas industriales (400 mg/L).



Extracción con dodecano



Cepa KEpHA1-1, medio simil mosto YAN 75, 11 días de fermentación

Mezclas sintéticas

	Mezcla 1 (100 mL BY pHA1-1)	Mezcla 2 (100 mL BY pHA1-1)	Mezcla 3 (isoprenoides:10L KE pHA1-1; alcoholes: destilación 1 L)
Compuesto	conc final en 1L gasolina (mg/L)	conc final en 1 L gasolina + 5% EtoH (mg/L)	conc final en 1L gasolina (mg/L)
Linalol	0.018	0.018	7.6
Geraniol	0.024	0.024	0.67
Nerolidol	0.035	0.035	3.5
Farnesol	0.03	0.03	3
Isobutanol	24	24	240
3-metil-1-butanol	10.8	10.8	108
alc beta feniletílico	8.6	8.6	86
Etanol	5,516	44,916	31,520

Mezclas sintéticas

	Mezcla 4	Mezcla 5	Mezcla 6	Mezcla 7	Mezcla 8
	conc final en 1L gasolina (mg/L)	conc final en 1L gasolina (mg/L)	conc final en 1L gas oil (mg/L)	conc final en 1L gas oil (mg/L)	conc final en 1L gas oil (mg/L)
2,6,10-trimethyldodecane=farnesane (corresponde a nerolidol y farnesol hidrogenados)		6.21		4.14	124.14
R-(-)-2,6-dimethyloctane (corresponde a linalool y geraniol hidrogenados)		7.63		5.08	152.5
2-methylbutane (corresponde a 3- methyl-1-butanol y 2-methyl-1-butanol hidrogenados)		883.64		589.09	
Ethylcyclohexane (corresponde a phenethyl alcohol hidrogenado)		789.51		526.34	
Dodecane	30,000	30,000	20,000	20,000	20,000

Conclusiones

- Es posible sobreproducir isoprenoides volátiles en *Saccharomyces cerevisiae* en ausencia de genes o precursores vegetales.
- Las condiciones para producir altos niveles de isoprenoides son diferentes de las necesarias para lograr altos niveles de alcoholes superiores.
- Se ensayó con éxito la extracción de isoprenoides con dodecano, método que se podría usar en un escalado industrial.
- Todas las mezclas sintéticas se agregaron como aditivos en un 5%. Las propiedades combustibles de la gasolina o gasoil con el agregado de estos aditivos no se salieron de especificaciones

Actividades de difusión

Camesasca L, Salzman V, Minteguiaga M, Fariña L, Dellacassa E, Boido E, Carrau F, Aguilar P y Gaggero C. 2013. Sobreproducción de isoprenoides biocombustibles en *Saccharomyces cerevisiae*. 4tas Jornadas Sudamericanas de Biología y Biotecnología de Levaduras. 2-3 setiembre, Santiago de Chile, Chile. Presentación oral por Camesasca.

Camesasca L, Minteguiaga M, Fariña L, Salzman V, Carrau F, Aguilar P, Gaggero C. 2014. COQ1 overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* results in increased levels of isoprenoids. 114th General Meeting, American Society for Microbiology, May 17-20, Boston, Massachusetts, USA.

Camesasca L, Minteguiaga M, Fariña L, Salzman V, Carrau F, Aguilar PS y Gaggero C. 2014. Modificación genética de *Saccharomyces cerevisiae* para lograr altos niveles de isoprenoides de interés como biocombustibles. XV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, Piriápolis, Uruguay, 5-7 setiembre.

Camesasca L. 2015. Ingeniería metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de biocombustibles. Tesis de Maestría en Biotecnología (defensa prevista para el 13 de nov 2015)

Camesasca L, Minteguiaga M, Fariña L, Salzman V, Carrau F, Aguilar PS, Gaggero C. 2015. Overproduction of volatile isoprenoids by *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of plant genes or plant precursors (enviado)

Perspectivas futuras

- Introducir la mutación *erg20* y el plásmido pHA1-1 en una cepa industrial para lograr altos niveles de monoterpenos
- Expresar una farnesene sintasa de *Vitis vinifera* cv Tannat (ya que contamos con el genoma y transcriptoma de Tannat: Plant Cell 25:4777) para lograr altos niveles del sesquiterpeno farnesene
- Para un escalado industrial se podría utilizar el método de extracción de isoprenoides con dodecano