

Desarrollo de una cepa de *Escherichia coli* especializada en la producción de bioetanol a partir del glicerol excedente de la producción de biodiesel

Proyecto FSE_1_2011_1_6383

Dr. Francisco Noya

Dra. Inés Loaces

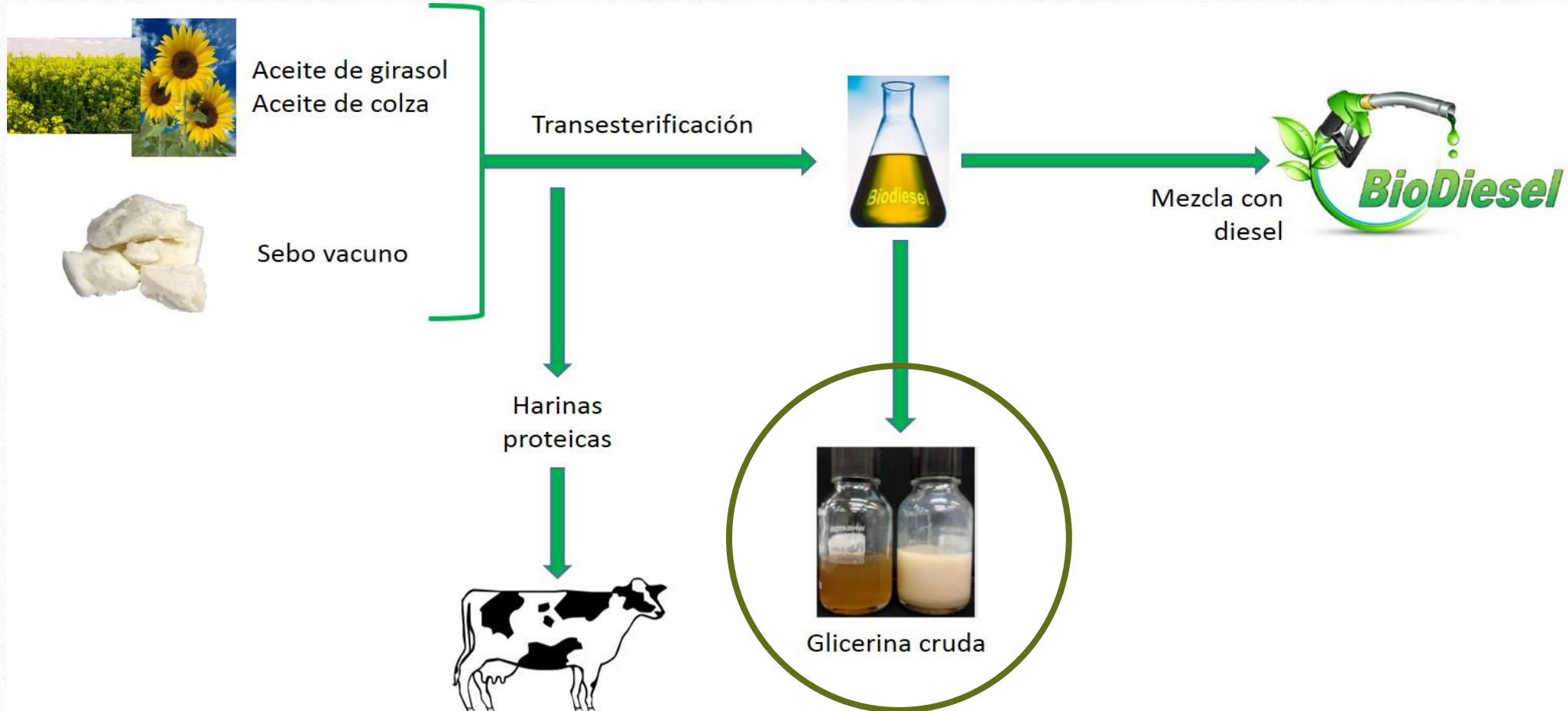
Mag. Cecilia Rodríguez

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas

Instituto de Investigaciones Biológicas “Clemente Estable”



Biodiesel



Glicerina cruda

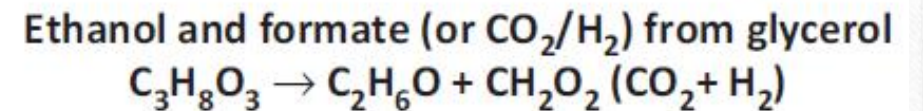
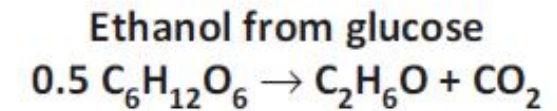
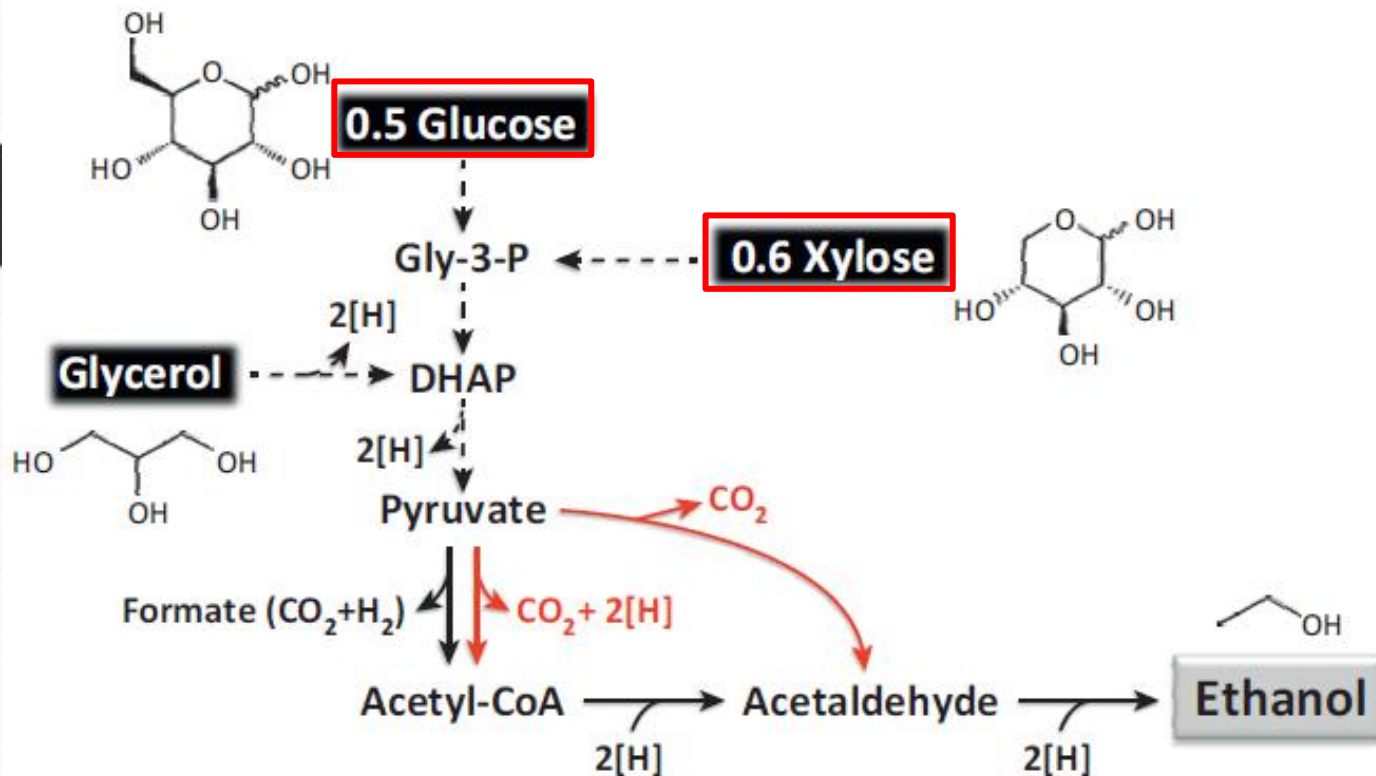


Glicerina
neutralizada

Glicerina sin
neutralizada

Componente	%
Glicerol	74,6
Metanol	4,0
Cenizas	4,7
Agua	2,8
MONG	13,9
pH	10-12

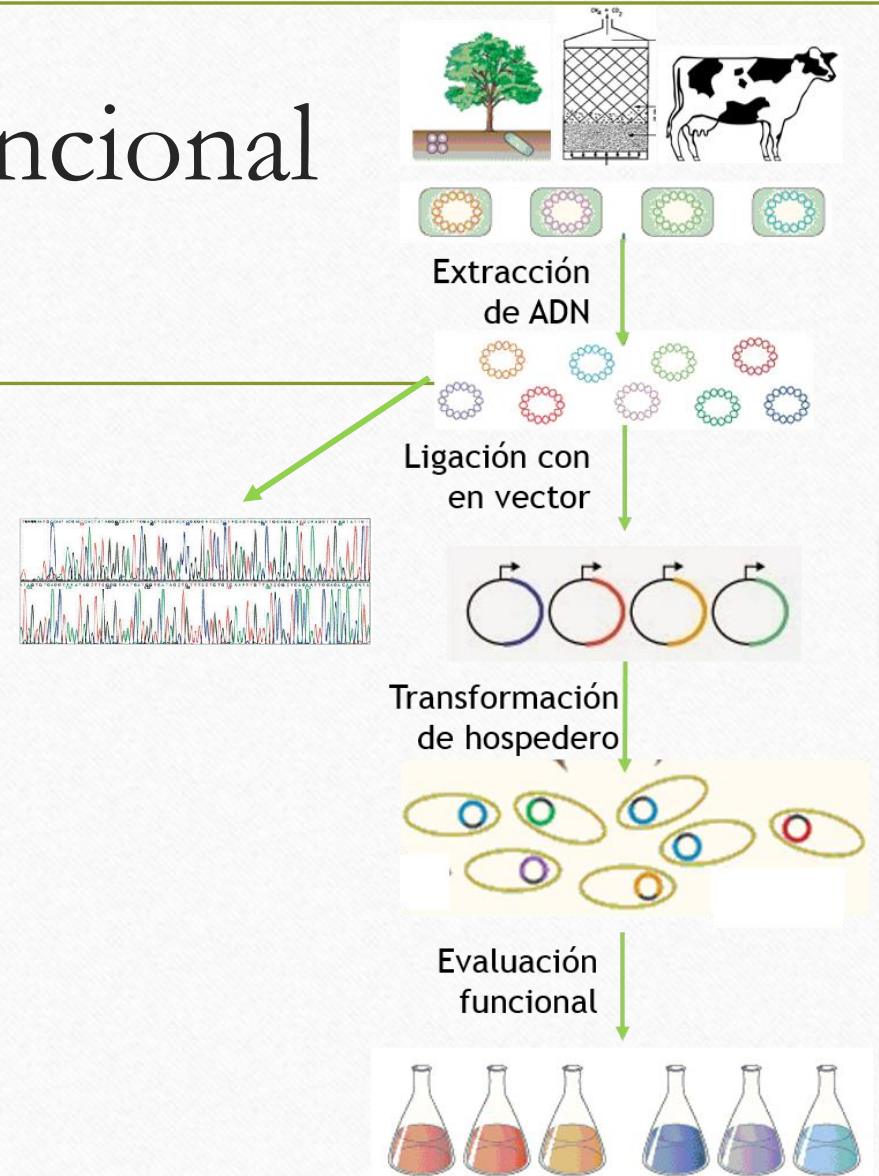
Producción de etanol a partir de glicerol



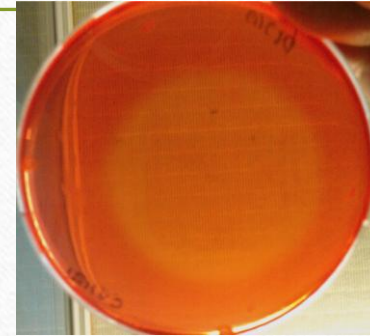
Metagenómica

Metagenómica funcional

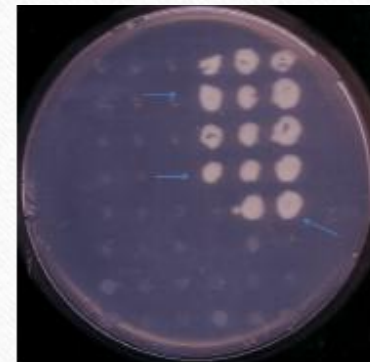
- ❑ Método de bioprospección
 - ❑ Se puede acceder al genoma de microorganismo no cultivables
 - ❑ Enzimas novedosas con potencial aplicación biotecnológica
- ❑ Sesgos
 - ❑ Método de extracción de ADN
 - ❑ Vector de expresión
 - ❑ Hospedero
 - ❑ Métodos de screening funcional



Metagenómica en el laboratorio



Carboximetil-celulosa

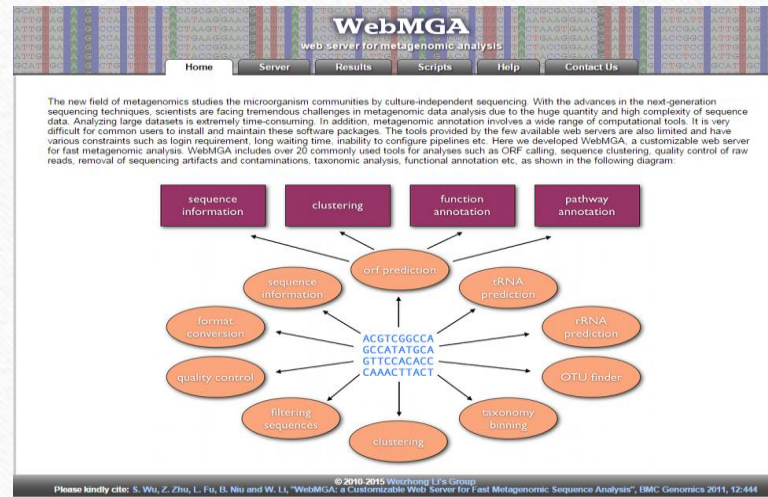


Glicerina cruda

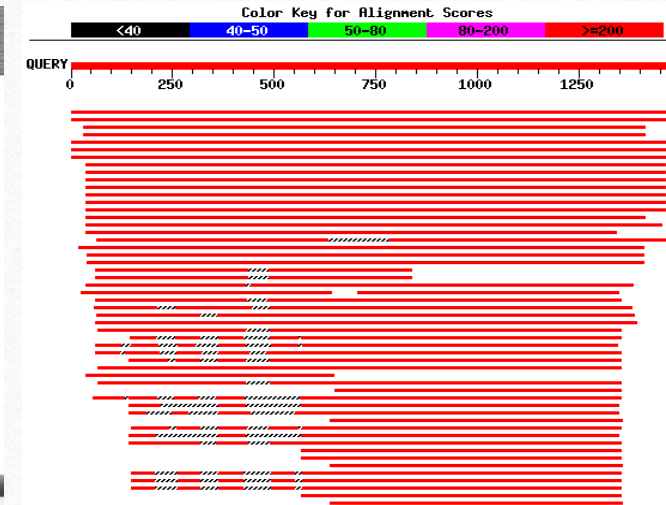
Secuenciación y análisis bioinformático



Secuenciado masivo por Ion Torrent



Asignación de ORFs por MetaGene en WebMGA
(Wu et al. 2011, Noguchi et al. 2006)



Comparación de ORFs con base de datos
NCBI

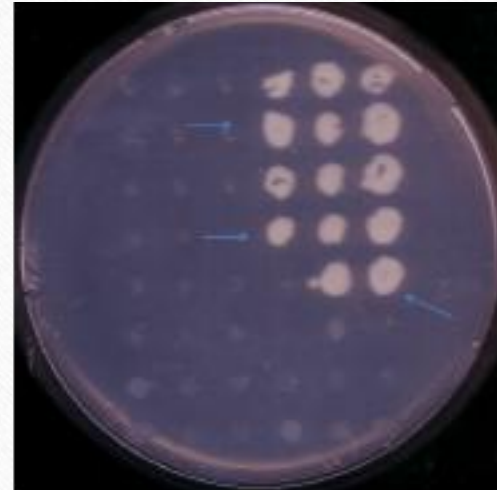
Selección de clones

Resultados

Evaluación funcional

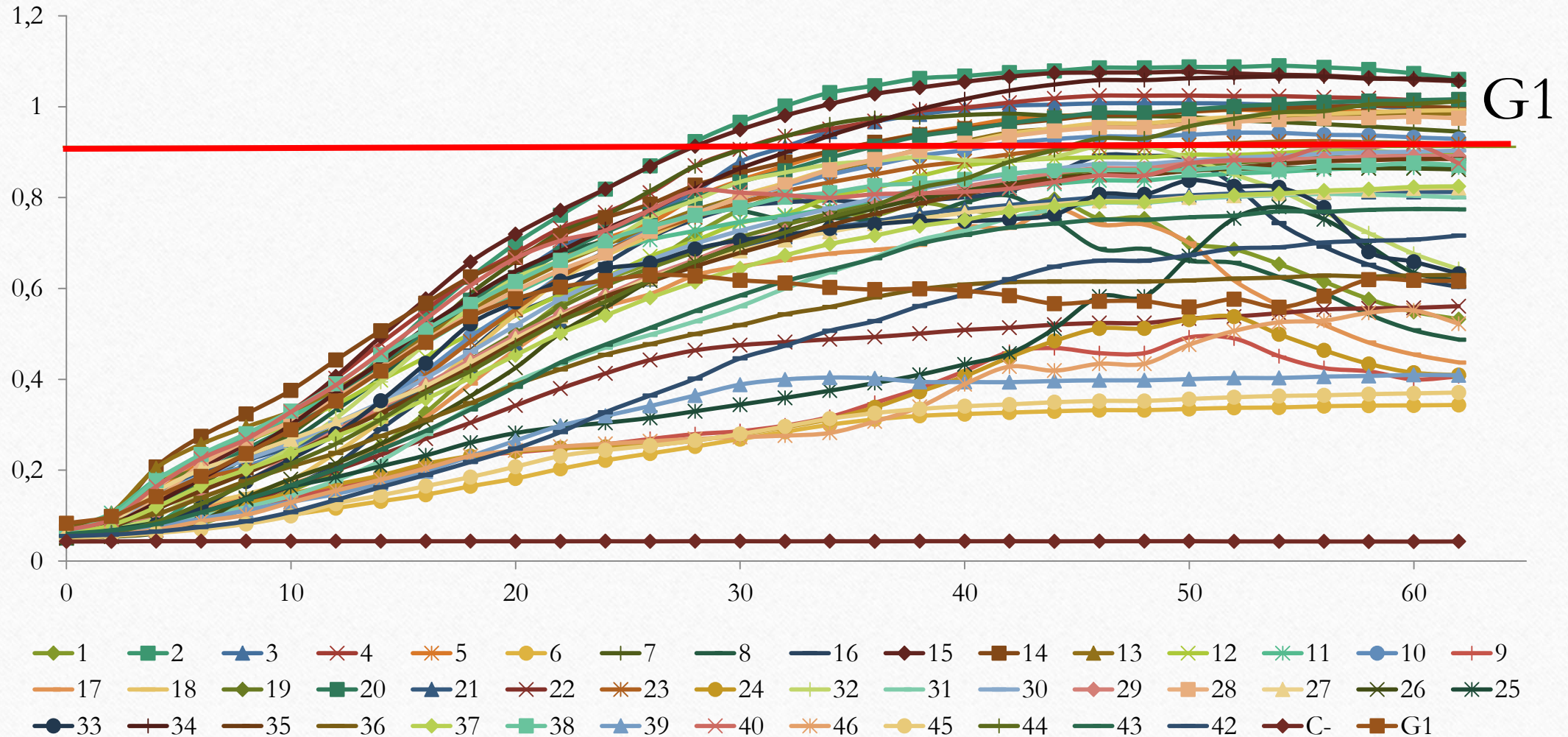


Recuperación de clones en LB-Cm.
Incubación a 37°C, 16 hs, sin agitación.



Crecimiento
en placa

Crecimiento en líquido



Producción de etanol a partir de glicerina usando G1

Resultados

Plásmido etanologénico

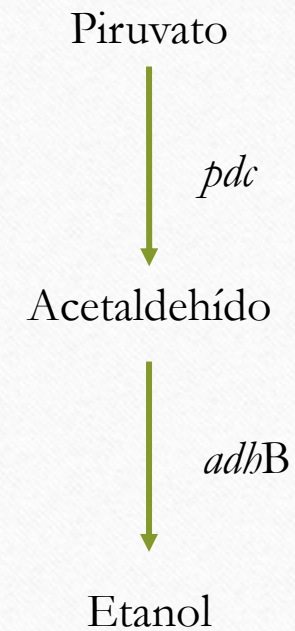
- ❑ pLO1297 (Ohta *et al.* 1991).

- ❑ Genes PET de *Zymomonas mobilis*:

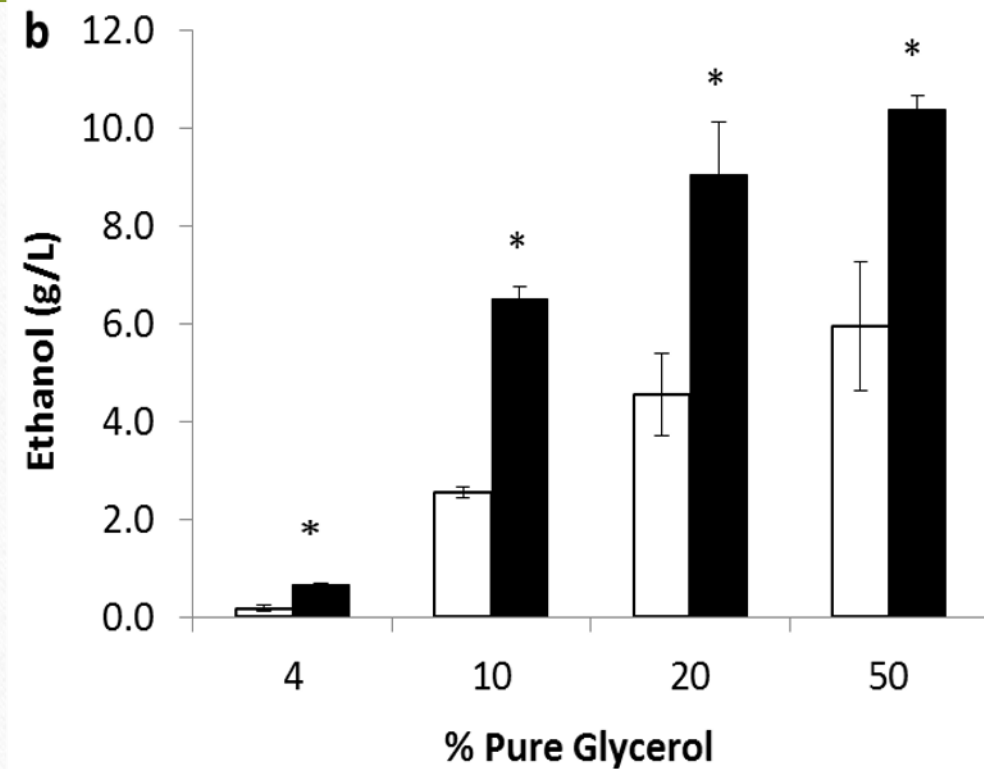
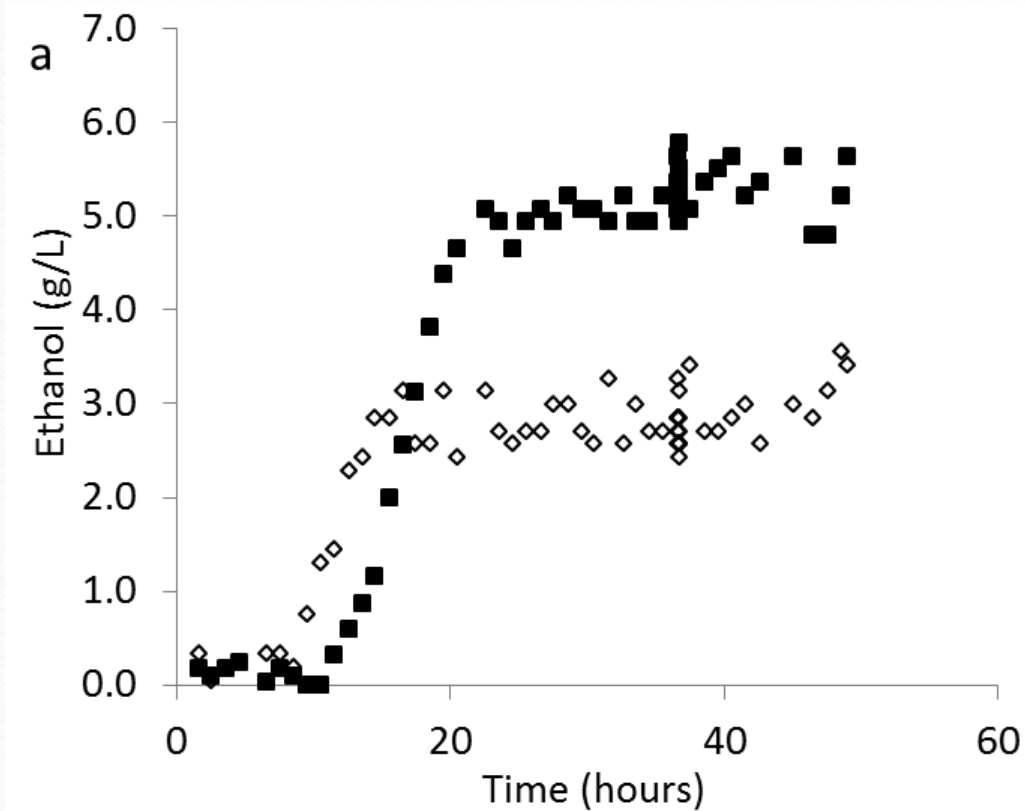
- ❑ Alcohol deshidrogenasa

- ❑ Piruvato decarboxilasa

- ❑ TcR.

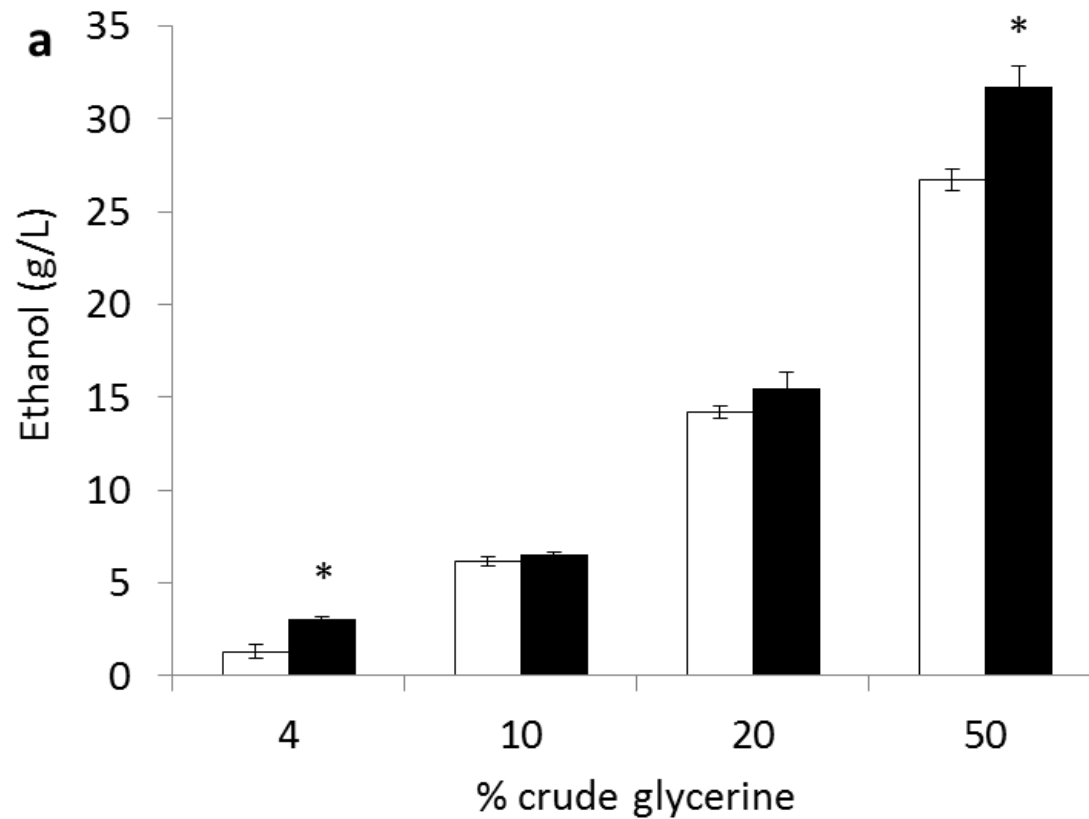


Producción etanol usando glicerol puro



Epi300 (G1, pLO1297)

Producción etanol usando glicerina de ALUR



Co-producción:

Acético 4.6 g/L

Propiónico 3.7 g/L

Succínico 1.9 g/L

Epi300 (G1, pLO1297)

Cepa etanologénica LY180

- LY180 (Miller *et al.* 2009).

- Δ lactato

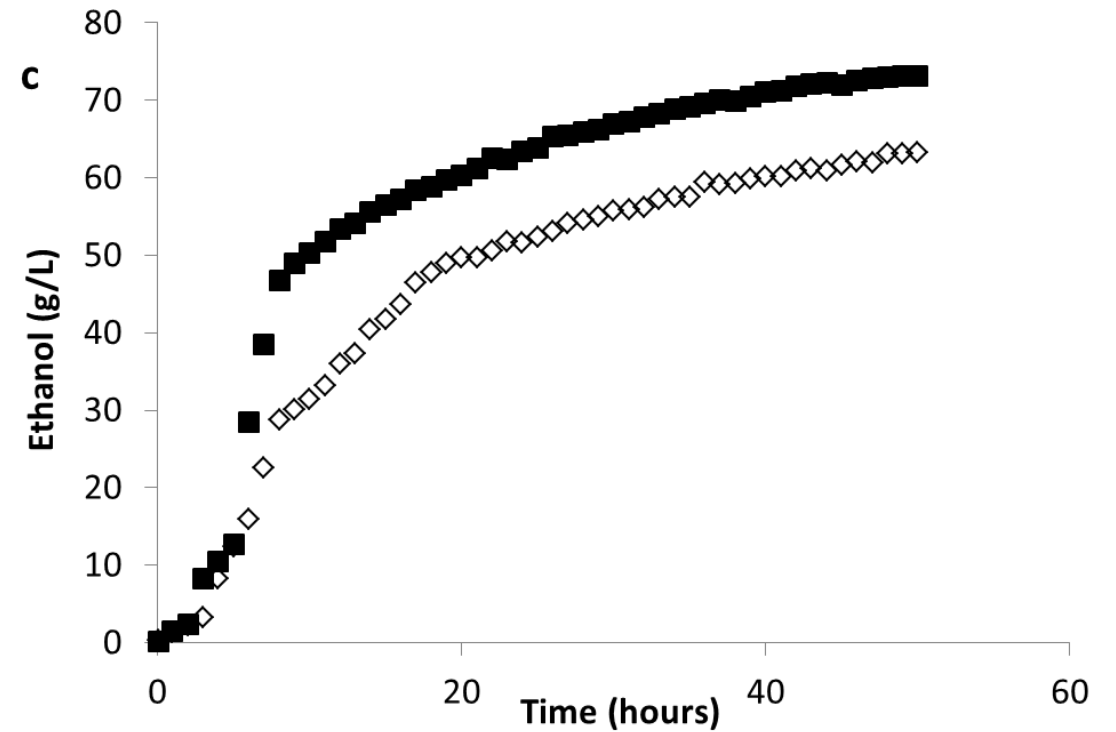
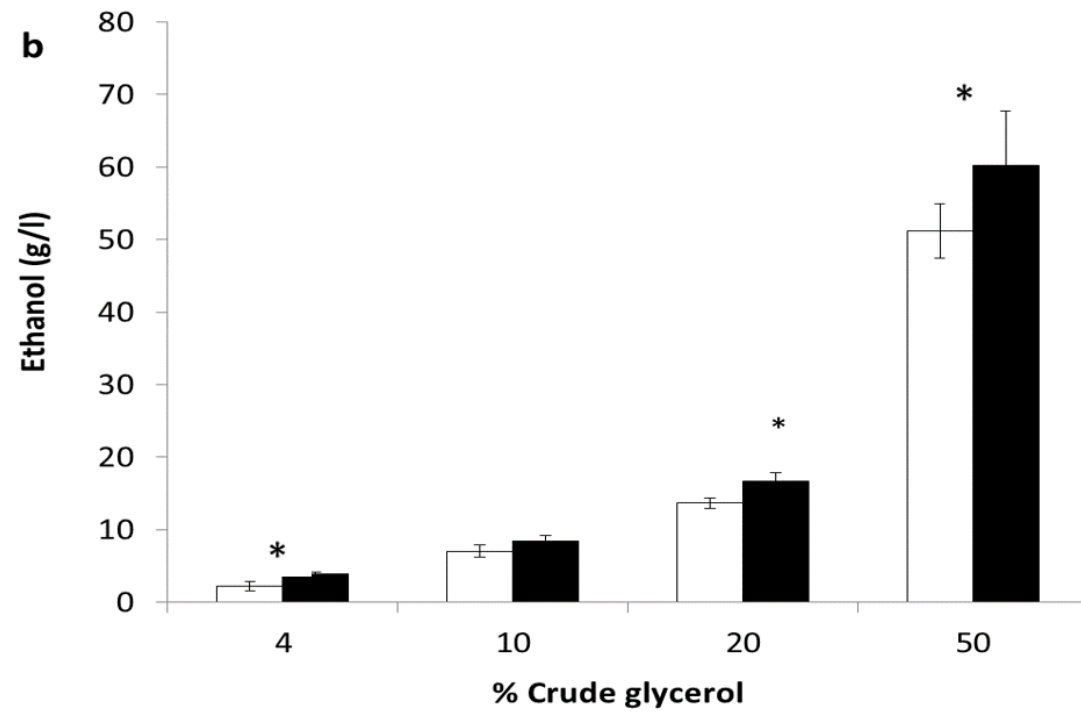
- Δ etOH

- Δ succinato

- $rrlE::(pdc\ adhA\ adhB)$

- Operón PET de *Z. mobilis*

Producción etanol usando glicerina



LY180 (G1)

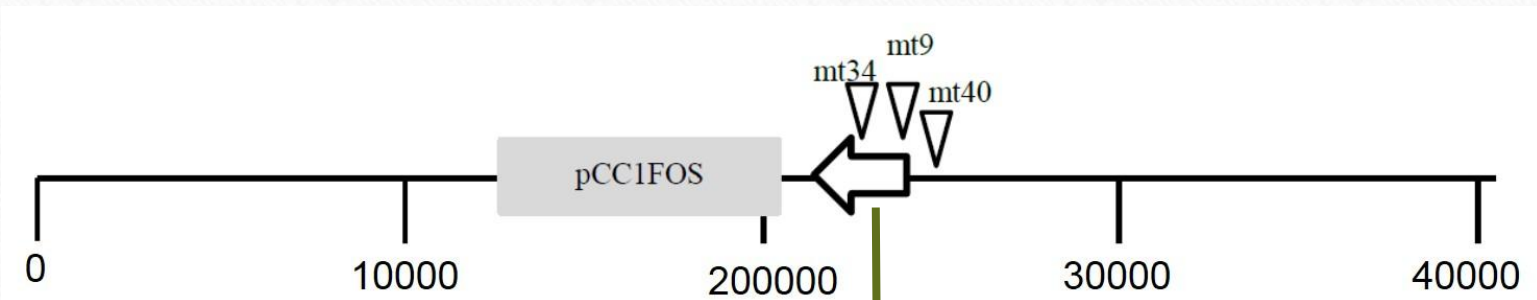
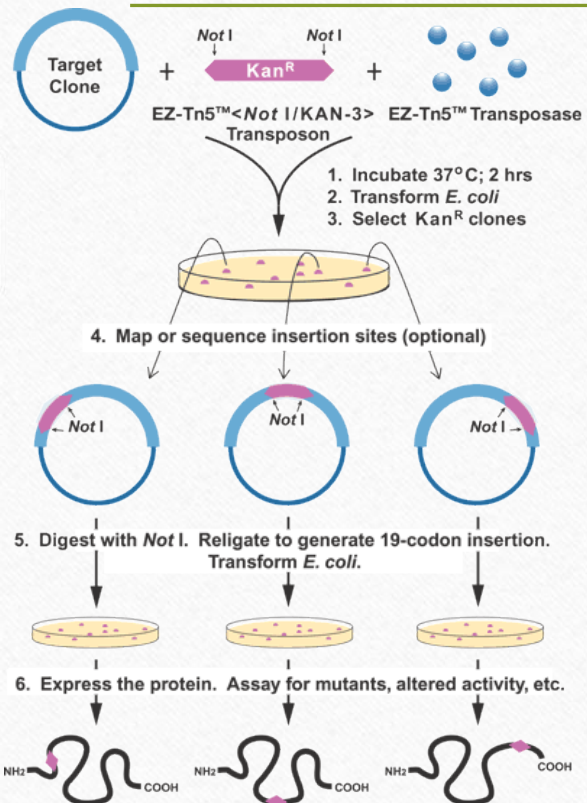
Secuenciación del fósforo

Resultados

Genotipo de G1

- ❑ 41312 pb
- ❑ Phylum Bacteroidetes (*Alistipes* sp.)
- ❑ 38 ORFs
- ❑ La mayoría presenta homología con proteínas no caracterizadas

Identificación del ORF

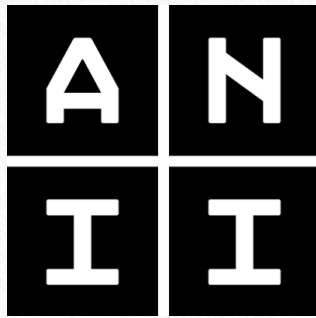


30% IS con proteínas hipotéticas
Péptido señal: 20 aa
Motivo transmembrana

Producción de etanol – Resumen

Cepa	Fuente de C	Etanol (g/L)
Epi300 (G1, pLO1297)	Glicerol Puro	10 ± 1
Epi300 (G1, pLO1297)	Glicerina Cruda	32 ± 1
LY180 (G1)	Glicerina Cruda	75 ± 3
Control	Glicerina Cruda	6 ± 1

Agradecimientos



loaces.ines@gmail.com

fnoya@geocom.com.uy