BÚSQUEDA DE NUEVAS ENZIMAS PARA LA CONVERSIÓN DE BIOMASA EN ETANOL

Proyecto FPTA-256 Viabilización de la producción de etanol en base a biomasa a través de la identificación de enzimas hidrolíticas en diversas microbiotas

Responsable del Proyecto: Francisco Noya*

Equipo de trabajo: Inés Loaces, Cecilia Rodríguez, Vanesa Amarelle, Elena Fabiano, Francisco Noya (Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas, Instituto de Investigaciones Biológicas «Clemente Estable», Montevideo, Uruguay)

* Investigador Asociado III, Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas, Instituto de Investigaciones Biológicas «Clemente Estable».

Título: BUSQUEDA DE NUEVAS ENZIMAS PARA LA CONVERSION DE BIOMASA EN ETANOL

Responsable del Proyecto: Francisco Noya

Equipo de trabajo: Inés Loaces, Cecilia Rodríguez, Vanesa Amarelle, Elena Fabiano, Francisco Noya

Serie: FPTA N° 47

© 2013, INIA

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del INIA

Andes 1365, Piso 12. Montevideo - Uruguay
http://www.inia.org.uy

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Esta publicación no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Integración de la Junta Directiva

Ing. Agr., MSc., PhD. Álvaro Roel - Presidente

D.M.T. V., PhD. José Luis Repetto - Vicepresidente

MINISTERIO DE GANADERÍA AGRICULTURA Y PESCA
REPÚBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

D.M.V. Álvaro Bentancur

D.M.V., MSc. Pablo Zerbino

Ing. Agr. Joaquín Mangado

Ing. Agr. Pablo Gorriti

FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) fue instituido por el artículo 18º de la ley 16.065 (ley de creación del INIA), con el destino de financiar proyectos especiales de investigación tecnológica relativos al sector agropecuario del Uruguay, no previstos en los planes del Instituto.

El FPTA se integra con la afectación preceptiva del 10% de los recursos del INIA provenientes del financiamiento básico (adicional del 4o/oo del Impuesto a la Enajenación de Bienes Agropecuarios y contrapartida del Estado), con aportes voluntarios que efectúen los productores u otras instituciones, y con los fondos provenientes de financiamiento externo con tal fin.

EL FPTA es un instrumento para financiar la ejecución de proyectos de investigación en forma conjunta entre INIA y otras organizaciones nacionales o internacionales, y una herramienta para coordinar las políticas tecnológicas nacionales para el agro.

Los proyectos a ser financiados por el FPTA pueden surgir de propuestas presentadas por:

a) los productores agropecuarios, beneficiarios finales de la investigación, o por sus instituciones.

b) por instituciones nacionales o internacionales ejecutoras de la investigación, de acuerdo a temas definidos por sí o en acuerdo con INIA.

c) por consultoras privadas, organizaciones no gubernamentales o cualquier otro organismo con capacidad para ejecutar la investigación propuesta.

En todos los casos, la Junta Directiva del INIA decide la aplicación de recursos del FPTA para financiar proyectos, de acuerdo a su potencial contribución al desarrollo del sector agropecuario nacional y del acervo científico y tecnológico relativo a la investigación agropecuaria.

El INIA a través de su Junta Directiva y de sus técnicos especializados en las diferentes áreas de investigación, asesora y facilita la presentación de proyectos a los potenciales interesados. Las políticas y procedimientos para la presentación de proyectos son fijados periódicamente y hechos públicos a través de una amplia gama de medios de comunicación.

El FPTA es un instrumento para profundizar las vinculaciones tecnológicas con instituciones públicas y privadas, a los efectos de llevar a cabo proyectos conjuntos. De esta manera, se busca potenciar el uso de capacidades técnicas y de infraestructura instalada, lo que resulta en un mejor aprovechamiento de los recursos nacionales para resolver problemas tecnológicos del sector agropecuario.

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria contribuye de esta manera a la consolidación de un sistema integrado de investigación agropecuaria para el Uruguay.

A través del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), INIA ha financiado numerosos proyectos de investigación agropecuaria a distintas instituciones nacionales e internacionales. Muchos de estos proyectos han producido resultados que se integran a las recomendaciones tecnológicas que realiza la institución por sus medios habituales.

En esta serie de publicaciones, se han seleccionado los proyectos cuyos resultados se considera contribuyen al desarrollo del sector agropecuario nacional. Su relevancia, el potencial impacto de sus conclusiones y recomendaciones, y su aporte al conocimiento científico y tecnológico nacional e internacional, hacen necesaria la amplia difusión de estos resultados, objetivo al cual se pretende contribuir con esta publicación.

CONTENIDO

Pág.

RESUMEN 9

INTRODUCCIÓN 9

MATERIALES Y MÉTODOS 10

- Obtención de muestras 10
- Obtención de ADN metagenómico 11
- Construcción de las metagenotecas y selección de actividades enzimáticas de interés 11
- Pretratamiento de bagazo de caña 11
- Secuenciación y análisis bioinformático 11
- Producción y detección de etanol 11
- Determinación de glucosa y celobiosa 12

RESULTADOS 12

- Construcción de metagenotecas 12
- Selección de las actividades de interés 12
- Capacidad de crecimiento en papel de filtro como única fuente de carbono 12
- Producción de etanol utilizando papel de filtro 14
- Utilización del bagacillo de caña de azúcar 14
- Secuenciación y análisis bioinformático del clon M9F1 15

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 18

AGRADECIMIENTOS 20

BIBLIOGRAFÍA 20

Inés Loaces*
Cecilia Rodríguez*
Vanesa Amarelle*
Elena Fabiano*
Francisco Noya*

*Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas

Búsqueda de nuevas enzimas para la conversión de biomasa en etanol

Proyecto FPTA 256

Período de Ejecución: May. 2009-Jul. 2012

RESUMEN

El uso de combustibles fósiles constituye actualmente una de las mayores fuentes de emisión de gases con efecto invernadero. La búsqueda de fuentes de energía renovables se presenta como uno de los desafíos cruciales con los que se enfrenta actualmente la Humanidad. Una nueva matriz energética basada en fuentes de energía renovables debe contemplar entre sus principales elementos a los biocombustibles líquidos. El Uruguay ya ha iniciado este camino y hoy se encuentra produciendo los dos principales biocombustibles líquidos: bioetanol y biodiesel. La diversificación de las materias primas utilizadas para obtener estos combustibles es indispensable para asegurar la independencia energética. La biomasa vegetal lignocelulósica es una alternativa abundante, ubicua y conveniente ya que se obtiene como un subproducto de distintas cadenas agroindustriales. En la actualidad, el paso limitante en la conversión de lignocelulosa en etanol es la sacarificación enzimática de la biomasa para obtener azúcares fermentables a partir de los cuales se produce el etanol. Este trabajo planteó desarrollar un microorganismo capaz de facilitar la producción de etanol lignocelulósico sin necesidad de enzimas exógenas. Para ello se utilizaron técnicas de metagenómica funcional utilizando como material de partida las comunidades microbianas aisladas de hábitats naturales como ser el rumen bovino o los lodos de reactores anaerobios de tratamiento de efluentes. El material genético de estas comunidades fue seleccionado por su capacidad para favorecer el crecimiento de *Escherichia coli* en material lignocelulósico como única fuente de carbono. Uno de los fragmentos obtenidos, denominado M9F1, fue capaz de permitir el crecimiento de *E.coli* tanto en papel de filtro como en bagazo de caña de azúcar. Además, cuando se lo introdujo en una cepa etanologénica, se pudo constatar la fermentación de etanol a partir de papel. La secuencia de M9F1 reveló genes relacionados con el metabolismo de los polisacáridos pero ninguno de ellos presenta homologías significativas con celulasas, β-glucosidasas, xilanasas u otras glicosilhidrolasas conocidas.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevas fuentes de energía renovables se presenta como uno de los desafíos cruciales con los que se enfrenta actualmente la Humanidad. La alarmante acumulación atmosférica de gases de efecto invernadero producida principalmente por la quema de combustibles fósiles amenaza con producir un cambio climático global capaz de desencadenar un nuevo suceso de extinción masiva (Tans y Keeling, 2012).

En este contexto, las energías renovables son una alternativa viable, confiable y factible tanto para los países desarrollados como para aquellos en vías de desarrollo. La Agencia Internacional de la Energía (IEA) estima que para lograr mantener el calentamiento global en no más de 2 °C por encima de las temperaturas medias previas a la Revolución Industrial, será necesario aumentar cuatro veces la producción de biocombustibles avanzados para el año 2020 (IEA, 2020).

Uno de los principales biocombustibles es el bioetanol. Su producción consiste esencialmente en la degradación de polisacáridos complejos en azúcares simples y en su posterior fermentación alcohólica. Por lo tanto, las materias primas de este proceso pueden ser sumamente diversas. En la actualidad, las más utilizadas industrialmente son el almidón del maíz y la sacarosa de la caña de azúcar.

Sin embargo, es la lignocelulosa el polisacárido de glucosa más abundante, más barato y mejor distribuido del mundo. La lignocelulosa es el principal componente de las paredes vegetales, en general, y de la madera, en particular. Es el polímero orgánico más abundante y el principal constituyente de la biomasa terrestre. Está compuesta esencialmente por celulosa, hemicelulosa y lignina en una estructura supramolecular altamente resistente a la degradación y oxidación. Debido a esta naturaleza recalcitrante solamente algunos microorganismos con sistemas enzimáticos especializados pueden digerirla (Kumar *et al.*, 2008).

Lignocelulosa apta para ser utilizada en la producción de bioetanol puede obtenerse de las partes no comestibles de cultivos tradicionales como el maíz, el trigo y el arroz, desechos forestales como aserrín y cortezas, desechos domésticos e industriales como papel y cartón, o de cultivos destinados a su producción como eucaliptus, álamos y mijo. Cualquiera sea su origen, esta materia prima no constituye un alimento para el hombre lo que representa una ventaja sobre el almidón del maíz o la sacarosa de la caña de azúcar (Hahn-Hagerdal *et al.,* 2006; Metagenomics, 2007; Tuck *et al.*, 2012).

El Uruguay cuenta con una buena capacidad de producción de lignocelulosa ya sea que ésta provenga de productos secundarios de la actividad agropecuaria (cáscara de arroz, rastrojo de trigo o maíz, bagazo de caña de azúcar, corteza de árboles) o constituya el producto principal de cultivos especializados.

Mediante el tratamiento hidrolítico adecuado, la lignocelulosa puede ser utilizada en la producción de bioetanol. El principal obstáculo para producir bioetanol a partir de lignocelulosa es el alto costo que actualmente tienen las enzimas lignocelulolíticas comerciales (Geddes *et al*.,2011).

Además, a escala industrial, estas enzimas son producidas y comercializadas por un pequeño número de proveedores, todos ellos extranjeros, lo que crearía una nueva dependencia de la matriz energética del país.

En este estudio nos hemos propuesto utilizar la metagenómica funcional como herramienta para aislar nuevas funciones metabólicas que puedan ser aplicadas a mejorar la producción de bioetanol lignocelulósico. Esencialmente, la metagenómica funcional consiste en la búsqueda de actividades de interés en el conjunto de los genomas integrantes de una comunidad microbiana natural como puede ser, por ejemplo, la que habita una muestra de suelo fértil. El primer paso para lograr este objetivo consiste en aislar el ADN total de la comunidad, fragmentarlo y clonarlo en vectores apropiados para obtener una colección de clones de *Escherichia coli* cada uno de los cuales ha incorporado un fragmento del ADN de la comunidad. Este conjunto de clones se llama biblioteca metagenómica o «metagenoteca» (Aakvik *et al.,* 2011).

En esta metagenoteca estarán representados fragmentos de material genético de especies bacterianas conocidas pero, sobretodo, de especies desconocidas que no pueden ser cultivadas en el laboratorio. Se estima que sólo el 1% de la diversidad bacteriana del planeta es cultivable en el laboratorio (Rappe y Giovannoni, 2003; Handelsman, 2004).

Esta metagenoteca se crece en medios de selección apropiados para detectar las actividades biológicas de interés. Por ejemplo, para buscar celulasas se crece la biblioteca en un medio conteniendo celulosa cristalina (avicel) como única fuente de carbono y se seleccionan aquellos clones capaces de crecer y degradarla.

Utilizando este enfoque desarrollamos metagenotecas a partir de comunidades microbianas especializadas en la degradación de biomasa vegetal. Estas bibliotecas fueron principalmente utilizadas para buscar actividades lignocelulolíticas. Los clones identificados fueron evaluados en cepas de *E.coli* llamadas «etanologénicas» porque son capaces de realizar la fermentación alcohólica de los azúcares liberados. Por último, para identificar los genes responsables de estas actividades, los fragmentos candidatos fueron secuenciados parcial o totalmente y analizados con herramientas bioinformáticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

La muestra de contenido ruminal fue obtenida de un novillo Holando de 480 kg

alimentado en praderas y sacrificado en el Frigorífico Pando (Canelones, Uruguay). La muestra de lodos anaerobios fue obtenida de un digestor alimentado con contenido ruminal [sólidos totales (ST) 19,3% (w/w) y sólidos volátiles (SV) 17,3% (w/w)], grasa de trinchado de curtiembre (ST 25,1% y SV 17,6%) y lodos de purga de lagunas anaerobias de una aceitera (ST 25,6% y SV 21,7%) el cual opera en el Departamento de Reactores de Facultad de Ingeniería (Universidad de la República, Montevideo, Uruguay). Todas las muestras fueron mantenidas a 4 °C hasta su procesamiento.

Obtención de ADN metagenómico

Para separar los microorganismos presentes en las muestras 500 µl de líquido ruminal o del lodo del digestor se diluyeron en 3 ml de PBS. Se agregaron 3 ml de Percoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) y se centrifugaron durante 20 minutos a 10.000 x *g*. Se separó la capa opalescente y se realizó la tinción de Gram para verificar la presencia de células bacterianas. La fracción celular se resuspendió en 1 ml de búfer de lisis (NaCl 700 mM, Tris-HCl 50 mM pH = 8,0, EDTA 100 mM, SDS 4%). Se agregaron bolitas de zirconia (aproximadamente 100 µl) y se agitó horizontalmente durante 30 segundos. Se incubó a 70 °C durante 15 minutos mezclando cada 5 minutos y se centrifugó a 4 °C durante 5 minutos a 16000 x *g*. El sobrenadante fue tratado con 15 µl de proteinasa K (20 mg/ml) durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente se agregaron 160 µl de CTAB 10% en NaCl 0,7 M y se incubó 10 minutos a 65 °C. El ADN se extrajo con fenol y cloroformo, se precipitó con isopropanol y se resuspendió en 200 µl de agua ultrapura.

Construcción de las metagenotecas y selección de actividades enzimáticas de interés

El ADN fue fraccionado por tamaño en geles de agarosa. Se seleccionaron aquellos fragmentos entre 35 y 45 kpb. Los fragmentos fueron clonados en el vector fosmídico pCC1FOS utilizando el kit CopyControl Fosmid Library Production (Epicentre Biotechnologies, Madison, EE.UU). y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se infectaron células de EPI300 y las transfectantes resistentes al cloranfenicol (12,5 µg/ml) se ordenaron en grupos de 10 o más clones en placas de 96 pocillos. Estos clones fueron evaluados en medio LB con el agregado de 0.2% carboximetil celulosa sal disódica (CMC) (Sigma-Aldrich) para detectar actividad celulasa y en LB con 0,5% de xilano de avena (Sigma-Aldrich) para detectar actividad xilanasa. Se incubaron las placas a 30 ºC durante 7 días y se revelaron con Rojo Congo durante 20 minutos. La presencia de un halo amarillo alrededor de la colonia se tomó como evidencia de la presencia de actividad glicolítica. A su vez se evaluó la capacidad de los clones de crecer en medio mínimo M9 ($MgSO_4$ 2 mM, $CaCl_2$ 0,1 mM, $Na_2HPO_4.7H_2O$ 12,8 g/l, KH_2PO_4 3 g/l, NaCl 0,5g/l, NH_4Cl 1g/l, timina 50 µg/ml, leucina 200 µM) con 0,5% de avicel como única fuente de carbono.

Pretratamiento de bagazo de caña

Bagazo de caña molido con un conteniendo de humedad del 54% fue obtenido de la empresa productora de alcoholes ALUR. Este sustrato fue sometido a dos tipos de pretratamiento: incubación con agitación durante 2 horas con ácido fosfórico 1% o con ácido sulfúrico 1%, seguido de 1 hora de autoclave a 121 °C. Luego de este tratamiento, la fracción líquida fue neutralizada con NaOH hasta lograr pH= 6,5 y la fracción sólida fue lavada 3 veces con abundante agua destilada. La biomasa obtenida se mantuvo a 4 ºC hasta su incorporación en placas de M9 en una concentración final de 1%.

Secuenciación y análisis bioinformático

La secuenciación de los fósmidos seleccionados se realizó mediante la técnica de shotgun por Macrogen Inc. (Seúl, República de Corea). El análisis bioinformático de la secuencia obtenida se realizó utilizando la plataforma CAMERA 2.0 (Sun *et al.*,2011).

Producción y detección de etanol

Fue evaluada la capacidad de utilizar papel de filtro y producir etanol a partir del mismo en condiciones aerobias (matraces) y anaerobias (Fleaker, Corning, EE.UU.). Se sembraron cultivos semilla en M9-glucosa 1% con los antibióticos correspondientes. Estos fueron utilizados para inocular medio M9 con papel de filtro 1% (w/v). La producción de etanol fue seguida mediante cromatografía gaseosa durante 48 horas (Agilent GC 6890N, inyector 7683B; columna megabore HP-PLOT de 15 m x 0,53 mm y 40 µm film).

Determinación de glucosa y celobiosa

La concentración de glucosa y celobiosa en el medio de cultivo fue determinada por HPLC utilizando un HPLC Waters (Milford, EE.UU.) detectados por índice de refracción. La separación se realizó en una columna Bio-Rad (Hercules, EEUU) Aminex HPPX-87P (300 mm x 7,8 mm d.i.) a 85 °C usando agua ultrapura como fase móvil (0,5 mL/min).

RESULTADOS

Construcción de metagenotecas

Para lograr los objetivos propuestos se comenzó con la construcción de bibliotecas metagenómicas a partir de muestras de comunidades microbianas obtenidas de distintos hábitats en donde tiene lugar la degradación de biomasa vegetal. Concretamente, se seleccionaron muestras de rumen bovino y de lodo de digestores anaerobios alimentados con contenido ruminal. En ambos casos se logró separar la fracción bacteriana y purificar su ADN. Este ADN fue fragmentado y clonado en fósmidos que fueron transfectados en células de *E.coli* EPI300.

Se obtuvieron 30.000 clones para la biblioteca construida a partir de contenido ruminal bovino y 100.000 para la biblioteca obtenida a partir de lodos de digestor anaerobio. Cada uno de estos clones alberga un fragmento de ADN metagenómico de 42 kpb en promedio.

Selección de las actividades de interés

Las metagenotecas fueron sembradas en medios conteniendo CMC o xilano de avena, con el fin de seleccionar actividades enzimáticas para celulasas o xilanasas. También se las colocó en medio mínimo con avicel como única fuente de carbono. El avicel es una forma de celulosa microcristalina. Se presume que los clones capaces de crecer en avicel tendrán, además de hidrolasas, los sistemas de transporte necesarios para secretar a estas enzimas y para internalizar a los glúcidos liberados. Los clones positivos primariamente fueron confirmados y sus fósmidos, reaislados, fueron utilizados para transformar células frescas. Cuando el fenotipo observado se repetía en estas células, se tomó como evidencia que las funciones de interés efectivamente provienen del fragmento metagenómico introducido y no de causas espúreas. Para descartar los posibles clones duplicados que hayan surgido de seleccionar dos o más veces el mismo fósmido, se realizaron perfiles de restricción de los fósmidos con la enzima EcoRV. En caso de constatarse idénticos perfiles de restricción en dos o más clones, se eligió un clon representante de la clase para continuar el estudio descartándose los duplicados.

De 58 clones positivos que presentaron una o más actividades de interés, se seleccionaron 13 para continuar el estudio en virtud de la reproducibilidad de sus fenotipos en medios de selección (Cuadro 1).

Capacidad de crecimiento en papel de filtro como única fuente de carbono

El papel de filtro está compuesto esencialmente por celulosa y su conversión en azúcares reductores es un ensayo comúnmente utilizado para determinar las actividades celulolíticas de enzimas purificadas. Se razonó que si los clones seleccionados producen enzimas celulolíticas, era posible que algunos de ellos fueran capaces de crecer en papel de filtro como única fuente de carbono.

Para evaluar esta alternativa se utilizó medio mínimo M9 al que se le agregó una tira de papel de filtro (Whatman N°2) como única fuente de carbono. Como controles

Cuadro 1. Colección inicial de clones con actividades de interés confirmadas seleccionados a partir de las metagenotecas crecidas en distintos medios

Clon	Origen	Características en medios de selección
Csd1	Rumen	Halo en CMC
Csd5	Rumen	Halo en CMC
Csd9	Rumen	Halo en CMC
Csd14	Rumen	Halo en CMC
Csd23	Rumen	Halo en CMC
Xil3	Rumen	Halo en xilano de avena
Xil4	Rumen	Halo en xilano de avena
Xil5	Rumen	Halo en xilano de avena
Lq5B10	Rumen	Crece en medio mínimo con avicel
BH8	Fermentador	Halo en CMC
EF9	Fermentador	Halo en CMC y xilano
M9F1	Fermentador	Crece en medio mínimo con avicel
M9F2	Fermentador	Crece en medio mínimo con avicel

negativos, se utilizaron el mismo medio pero sin el papel de filtro y la cepa parental sin los fósmidos seleccionados. La Figura 1 muestra un experimento tipo donde se aprecia crecimiento a partir de papel de filtro en presencia del fósmido M9F1. La Figura 2 muestra los recuentos obtenidos en estas condiciones.

Estos datos sugieren que el crecimiento de EPI300 (M9F1) en papel de filtro es lento y requiere de una fase lag relativamente extensa. Recién a partir de los 7 días post-inoculación comienza a observarse un aumento de la densidad celular. Por otra parte, si estos cultivos estaban creciendo a partir de la celulosa del papel, la integridad estructural de éste debería verse afectada con el tiempo. Para intentar observar esta transformación, se aumentó el volumen de los cultivos y se extendió el tiempo de incubación hasta 19 días. Luego de este período el papel de filtro incubado con EPI300 (M9F1) perdió casi totalmente su estructura macroscópica. Un efecto

Figura 1. Medio mínimo M9 conteniendo papel de filtro como única fuente de carbono a los 7 días post-inoculación. El tubo de la izquierda fue inoculado con la cepa EPI300 conteniendo un fósmido elegido al azar, como control negativo. El tubo de la derecha fue inoculado con la cepa EPI300 conteniendo el fósmido M9F1.

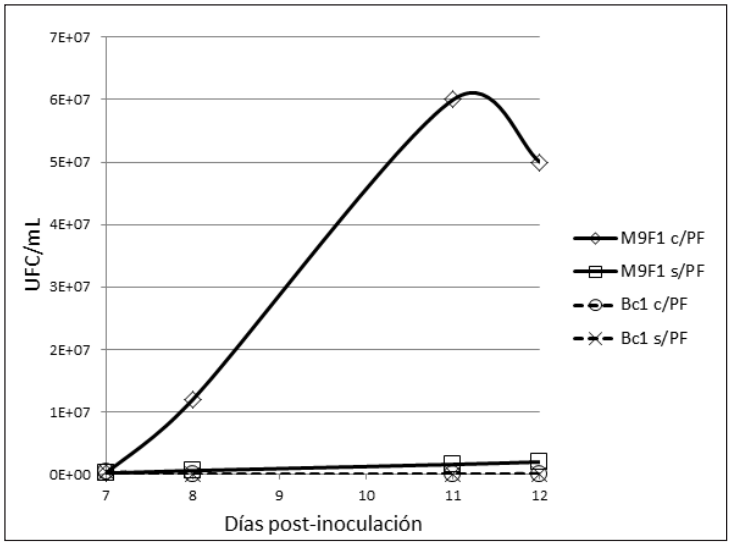

Figura 2. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), en presencia (c/PF) y ausencia (s/PF) de papel de filtro para EPI300 conteniendo M9F1 o un fósmido control (Bc1).

Figura 3. Cultivos de 19 días en medio mínimo M9 conteniendo 1% (w/v) de papel de filtro. De izquierda a derecha: LY180, LY180 (M9F1) y EPI300 (M9F1).

similar pero de menor intensidad se observó con la cepa etanologénica LY180 (M9F1) y no se observaron cambios en el papel en presencia de LY180 sin fósmido alguno (Figura 3).

Producción de etanol utilizando papel de filtro

Para determinar la capacidad de M9F1 para participar en la conversión de celulosa en etanol se utilizó la cepa etanologénica LY180 (Miller *et al.,* 2009). Esta cepa ha sido genéticamente modificada buscando maximizar la fermentación de hexosas y pentosas en etanol.

El fósmido M9F1 fue transformado en LY180 y la cepa resultante fue crecida en condiciones anaerobias en medio mínimo M9 conteniendo papel de filtro como única fuente de carbono. La producción de etanol a las 48 horas post-inoculación se determinó mediante cromatografía de gases. Paralelamente, se utilizó el plásmido pLOI297 (Ohta *et al.,* 1991) que porta los genes de piruvato decarboxilasa (*pdc*) y alcohol deshidrogenasa (*adhB*) de *Zymomonas mobilis* y que potencia la producción de etanol en cepas de *E.coli*. Este plásmido se utilizó para transformar a la cepa EPI300 conteniendo el fósmido M9F1 (Figura 4).

A continuación se estudió la cinética de producción de etanol conjuntamente con la liberación de glucosa y celobiosa, los productos principales de la degradación enzimática de la celulosa. Para ello los sobrenadantes de cultivos anaerobios conteniendo papel de filtro como única fuente de carbono fueron analizados por GC y HPLC. Como se observa en la Figura 5, se libera tanto glucosa como celobiosa al medio. Tal como se espera, la glucosa es rápidamente consumida lo que coincide con la aparición del etanol. La celobiosa es mantenida en niveles relativamente constantes a lo largo de todo el experimento.

Para comprobar si la presencia de M9F1 favorece el crecimiento en celobiosa, se realizaron curvas de crecimiento en medio mínimo M9 conteniendo celobiosa como única fuente de carbono. En la Figura 6 se puede observar que M9F1 favorece el crecimiento en celobiosa con respecto a la cepa control sin M9F1.

Utilización del bagacillo de caña de azúcar

Estos experimentos demuestran que M9F1 es necesario y suficiente para viabilizar el crecimiento de las cepas de *E.coli* estudiadas en papel de filtro como única fuente de carbono. Sin embargo, el papel de filtro no contiene lignina por lo que no constituye un sustrato lignocelulósico. Además, no representa una materia prima relevante desde el punto de vista del proceso industrial de una bio-refinería. Por estas

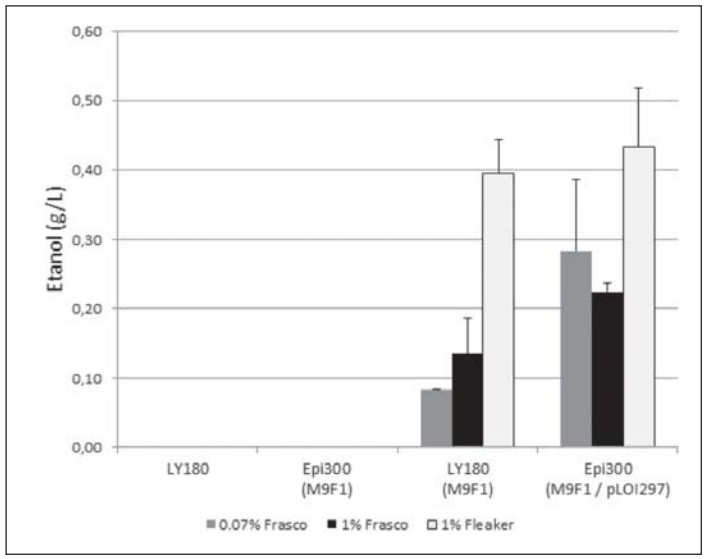

Figura 4. Producción de etanol a partir de papel de filtro (0,07% y 1%) a las 48h post-inoculación en dos condiciones anaerobias: frascos cerrados y Fleakers. Se muestran los promedios con la desviación estándar de tres determinaciones para la cepa LY180, la cepa EPI300 conteniendo el fósmido M9F1, la cepa LY180 conteniendo el fósmido M9F1 y la cepa Epi300 conteniendo el fósmido M9F1 y el plásmido etanologénico pLOI297.

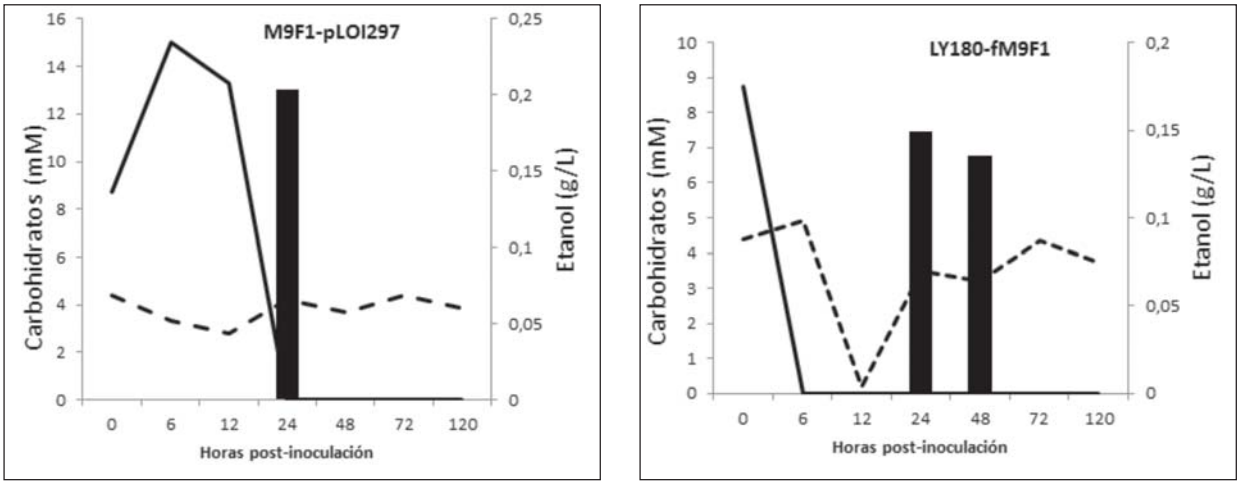

Figura 5. Concentración de etanol (barras), glucosa (línea continua) y celobiosa (línea punteada) a lo largo del tiempo para EPI300 conteniendo el fósmido M9F1 y el plásmido etanologénico pLOI297 (M9F1-pLOI297, panel izquierdo) y para LY180 conteniendo el fósmido M9F1 (LY180-fM9F1, panel derecho). Ambos experimentos fueron llevados a cabo en anaerobiosis, en medio mínimo con papel de filtro como única fuente de carbono.

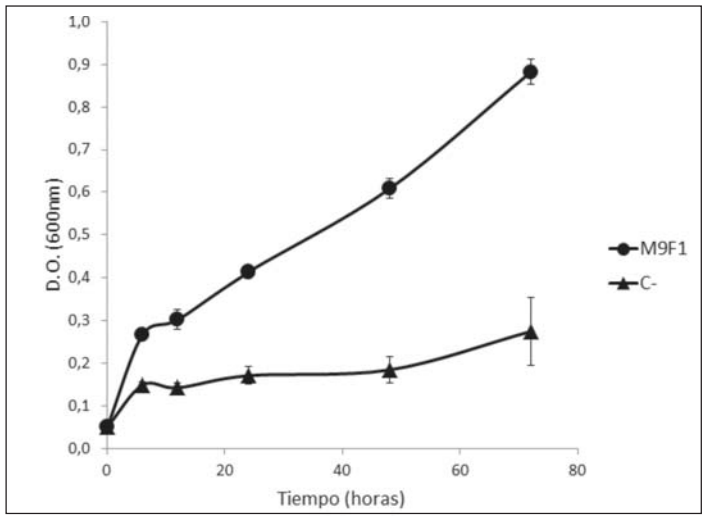

Figura 6. Curva de crecimiento de EPI300 transformada con M9F1 o con n fósmido control (C-) en medio mínimo M9 conteniendo celobiosa como única fuente de carbono. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres replicados.

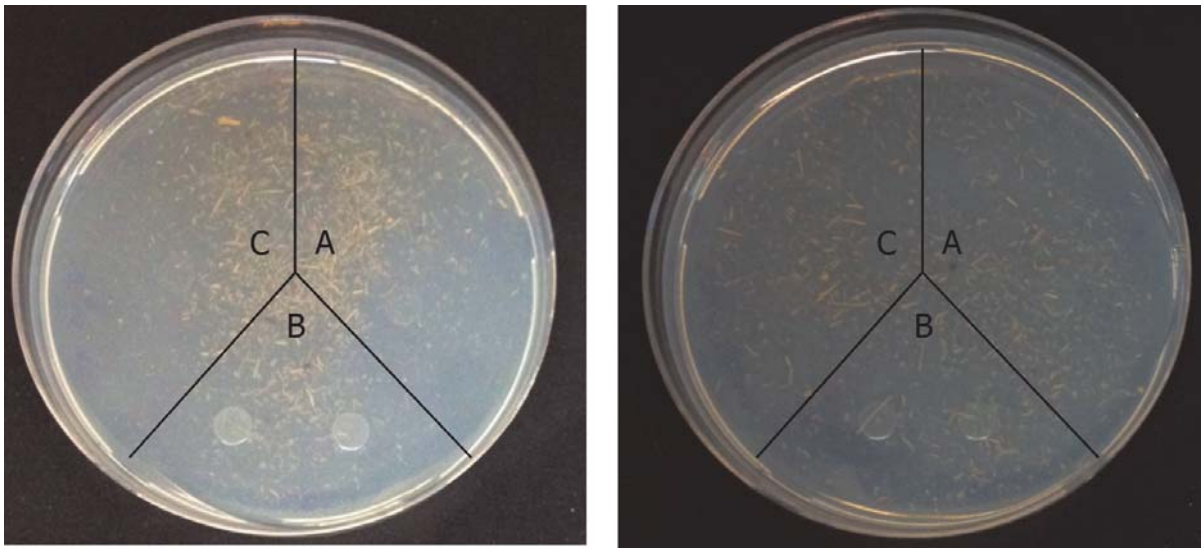

Figura 7. Placas conteniendo 1% de bagacillo de caña de azúcar pretratado con 1% de ácido sulfúrico (izquierda) o 1% de ácido fosfórico (derecha). Cada placa fue sembrada con dos gotas de 40µL de cada uno de los siguientes cultivos: (A) EPI300, (B) Epi300 (M9F1) y (C) LY180.

razones, se realizaron también ensayos en un sustrato de mayor valor agroindustrial como es el bagazo de caña de azúcar.

Bagazo de caña molido («bagacillo») conteniendo 54% de humedad fue provisto por la empresa productora de alcoholes ALUR (Artigas, Uruguay). Este sustrato fue sometido a pretratamiento con ácido fosfórico 1% o con ácido sulfúrico 1%, seguido de 1 hora de autoclave a 121 °C. La fracción sólida lavada con abundante agua destilada se incorporó en placas de medio mínimo M9 y agar a una concentración del 1%.

Como se muestra en la Figura 7, M9F1 es suficiente para permitir el crecimiento de EPI300 en bagacillo de caña de azúcar pretratado como única fuente de carbono.

Secuenciación y análisis bioinformático del clon M9F1

Con el propósito de obtener información acerca de los genes involucrados en estos fenotipos así como también determinar el microorganismo del que provienen, se secuenció el fósmido M9F1 en su totalidad mediante la técnica de «*shotgun*».

Se realizaron 962 reacciones de secuenciación por el método de Sanger. Luego de eliminar las secuencias provenientes de los vectores utilizados para la secuenciación así como las lecturas de baja calidad, quedaron 862 lecturas que fueron ensambladas en tres contigs con una cobertura promedio de 8.62X. Uno de los contigs estaba totalmente contenido en el pCC1FOS. Para completar la secuencia del inserto de M9F1 fue necesario secuenciar 435 bases adicionales a partir de los extremos de los otros dos contigs para lograr ensamblarlos y obtener una única secuencia de 33996 nucleótidos.

Mediante el algoritmo Metagene se identificaron un total de 28 marcos de lectura abiertos (ORFs). Las posibles funciones de estos ORFs fueron predichas basándose en su homología con clústers de grupos de ortólogos (COGs) y con las familias de proteínas Pfam (Cuadro 2).

A partir de estas predicciones se puede identificar en M9F1 un posible operón integrado por genes relacionados con el metabolismo de polisacáridos en el que se identifican varias glicosiltransferasas. Esas enzimas normalmente participan de la síntesis de polisacáridos de la pared celular aunque es posible que este operón participe también en el transporte de monosacáridos hacia el interior celular. De hecho, se identifican genes que podrían codificar para proteínas de membrana y permeasas.

Otro de los ORFs que llaman la atención es el #28 que codifica para una proteína no caracterizada que presenta un dominio YceI. Estos dominios son característicos tanto en proteínas del periplasma como

Cuadro 2. Asignaciones de los ORFs detectados en M9F1 en función de sus homologías con clústers de grupos de ortólogos (COGs) y con familias de proteínas Pfam. Los ORFs que no presentan homologías con ninguna secuencia conocida se presentan únicamente con su número y tamaño en aminoácidos

	Tamaño (AA)	COG	e-value COG	Descripción COG	Pfam	e-value Pfam	Descripción Pfam
1	49						
2	80						
3	224				PF09560	1.20E-44	Spore_YunB
4	459	COG0008	1.00E-109	Glutamyl- and glutaminyl-tRNA synthetases	PF00749	6.60E-132	tRNA-synt_1c
5	231	COG1215	5.00E-06	Glycosyltransferases, probably involved in cell wall biogenesis			
6	698	COG1216	9.00E-05	Predicted glycosyltransferases	PF00535	6.30E-08	Glycos_transf_2
7	361	COG0381	3.00E-85	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase	PF02350	1.30E-108	Epimerase_2
8	354	COG1086	6.00E-84	Predicted nucleoside-diphosphate sugar epimerases	PF02719	6.30E-113	Polysacc_synt_2
9	323	COG1091	5.00E-41	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	PF04321	1.00E-12	RmlD_sub_bind
10	92						
11	265						
12	151						
13	661	COG0463	2.00E-12	Glycosyltransferases involved in cell wall biogenesis	PF00535	1.20E-29	Glycos_transf_2
14	107	COG0564	5.00E-13	Pseudouridylate synthases, 23S RNA-specific	PF00849	1.30E-07	PseudoU_synth_2
15	111	COG3077	3.00E-08	DNA-damage-inducible protein J	PF04221	3.60E-11	RelB
16	147	COG0456	2.00E-08	Acetyltransferases	PF00583	9.50E-21	Acetyltransf_1
17	236	COG1187	2.00E-54	16S rRNA uridine-516 pseudouridylate synthase and related pseudouridylate synthases	PF01479	4.90E-06	S4

Continuación

18	**150**	**COG2707**	**7.00E-33**	**Predicted membrane protein**	**PF04284**	**8.90E-73**	**DUF441**
19	393	COG2807	3.00E-15	Cyanate permease	PF07690	5.60E-33	MFS_1
20	306	COG0583	1.00E-33	Transcriptional regulator	PF03466	1.70E-34	LysR_substrate
21	571	COG0507	2.00E-18	ATP-dependent exoDNAse (exonuclease V), alpha subunit - helicase superfamily I member			
22	672						
23	390	COG1454	1.00E-124	Alcohol dehydrogenase, class IV	PF00465	9.70E-199	Fe-ADH
24	343	COG2267	2.00E-26	Lysophospholipase	PF00561	8.90E-06	Abhydrolase_1
25	393	COG3284	3.00E-16	Transcriptional activator of acetoin/glycerol metabolism	PF01590	3.00E-05	GAF
26	503	COG1012	1.00E-145	NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	PF00171	7.40E-237	Aldedh
27	236	COG0518	5.00E-37	GMP synthase - Glutamine amidotransferase domain	PF00117	1.00E-12	GATase
28	194	COG2353	2.00E-42	Uncharacterized conserved protein	PF04264	6.90E-60	YceI

en proteínas secretadas. También se los encuentra asociados a módulos de unión a carbohidratos (CBMs) en celulasas (Stancik *et al.*,2002; Handa *et al.,* 2005). Si este gen efectivamente codificara una celulasa funcional, la misma tendría muy baja homología con las familias de celulasas conocidas. Su caracterización minuciosa será objeto de futuros estudios.

Entre las posiciones 2543 y 3557 del inserto se detectó un posible gen que codifica para un ARNr 16S. Este gen permite trazar un árbol filogenético para M9F1 utilizando la base de datos Green Genes (DeSantis *et al.,* 2006). Este análisis sugiere que el origen de M9F1 es una bacteria del filo Firmicutes. Posiblemente se trata de un Clostridiales relacionado con *Syntrophomonas* (Sieber *et al.*, 2010). Sin embargo, a excepción de esta región, el resto de M9F1 no presenta homología con ninguno de los genomas secuenciados de *Syntrophomonas*. Por lo tanto, es posible que el microorganismo no pertenezca a una especie caracterizada.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Este Proyecto planteó como objetivo el desarrollo de un microorganismo capaz de producir etanol a partir de biomasa vegetal. Además de ser capaz de degradar lignocelulosa y de fermentar etanol, el organismo ideal debe tener bajos requerimientos nutricionales y adaptarse bien tanto al laboratorio como al entorno industrial.

Una estrategia consiste en recurrir a genes y operones conocidos especializados en alguno de estos aspectos e introducirlos en un organismo que se destaque en las demás capacidades. Por ejemplo, mediante la introducción de genes de celulasas (β-glucosidasas, endo- y exo-glucanasas) de *Aspergillus aculeatus* y *Tricho-*

derma reesei en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* especializada en la producción de vinos se logró que esta última creciera en celulosa y produjera hasta 2,6% de etanol (Khramtsov *et al.,* 2011). La desventaja con este enfoque es que toma como punto de partida genes ya descriptos, con sus virtudes y limitaciones. La mayor parte de estos genes provienen de organismos «cultivables» o que pueden ser crecidos en condiciones de laboratorio. Sin embargo, más del 99% de los microorganismos, que a su vez constituyen el mayor reservorio genético del planeta, no pueden ser cultivados en el laboratorio (Rappe y Giovannoni, 2003).

En este trabajo se prefirió una estrategia alternativa basada en la metagenómica funcional para la búsqueda de nuevas enzimas lignocelulolíticas. Una de las fortalezas de este enfoque consiste en identificar genes novedosos que guardan poca o ninguna similitud con otros ya conocidos (Simon y Daniel, 2009). Se eligieron hábitats en los cuales es esperable encontrar comunidades microbianas especializadas en la degradación de lignocelulosa.

La estrategia de selección permitió identificar al menos 13 clones que demostraron algún fenotipo relevante frente a glucanos y xilanos. De aquí en adelante el estudio se centró en uno de ellos, el fósmido M9F1, que también tiene la capacidad de sostener el crecimiento de la cepa parental de *E.coli* en un medio mínimo conteniendo papel de filtro como única fuente de carbono. La presencia de M9F1 parece promover la liberación de glucosa y celobiosa al medio de cultivo que son los productos esperados de la acción de las exo- y endoglucanasas, así como de las β-glucosidasas. De hecho, también se confirmó que M9F1 tiene la capacidad de crecer mejor en celobiosa que la cepa parental.

Para identificar a los genes responsables de estos fenotipos se procedió a secuenciar completamente el inserto metagenómico del fósmido M9F1. Tal como se espera del ADN aislado de comunidades microbianas naturales, la secuencia de M9F1 guarda muy poca homología con cualquier secuencia conocida. Si bien el organismo de origen parece estar emparentado con el género *Syntrophomonas*, ninguno de los genes identificados presenta homología con genes de las especies de este género. En función de su similitud con *Syntrophomonas*, es posible que el fragmento M9F1 provenga de un microorganismo anaerobio, Gram-negativo, posiblemente con capacidad de esporular (ver también el ORF #3 del Cuadro 2) y con altas demandas nutricionales. Es posible que establezca estrechas relaciones sintróficas con otras especies presentes en su ambiente lo que podría hacer muy dificultoso su aislamiento o crecimiento en medios estériles.

Con respecto a los genes identificados en M9F1 ninguno de ellos muestra homología con ninguna de las familias de glicosilhidrolasas descritas en la base de datos CAZy (Cantarel *et al.*, 2009) lo que podría subrayar el carácter novedoso de los genes contenidos en este fragmento. Llama la atención la presencia de un clúster de glicosiltransferasas entre los ORFs 5 y 13 (Cuadro 2) que podría jugar algún papel en la degradación de las paredes celulares. Sin embargo, demostrar fehacientemente si son éstos los genes responsables de los fenotipos observados dependerá de estudios que están actualmente en curso.

La introducción del fósmido M9F1 en *E.coli* confirió a esta bacteria la capacidad de utilizar celulosa como única fuente de carbono. Sin embargo, para producir etanol en estas condiciones hicieron falta elementos genéticos adicionales. *E.coli* es capaz de fermentar etanol pero también puede producir ácido láctico reduciendo el rendimiento del cultivo. Además, *E.coli* tiene un fuerte sistema de represión por catabolito mediante el cual la presencia de glucosa bloquea tanto el transporte como la utilización de otros azúcares. La cepa LY180 contiene mutaciones en las vías de producción de lactato y en la represión por catabolito(Miller *et al.*, 2009). Si bien esta cepa es incapaz de producir etanol en condiciones anaerobias utilizando papel de filtro como única fuente de carbono, sí puede hacerlo cuando se le introduce M9F1. Un resultado similar se observó cuando a la cepa parental EPI300 con el fósmido M9F1 se le agregó también el plásmido pLOI297 que porta genes de *Z.mobilis* capaces de derivar el flujo de carbono desde el lactato hacia el etanol (Alterthum e Ingram, 1989).

Desde un punto de vista práctico, M9F1 confiere a *E.coli* la capacidad de crecer en una materia prima abundante y de bajo costo como lo es el bagazo de caña de azúcar. El bagazo y la vinaza son los

principales productos secundarios de la producción de bioetanol a partir caña de azúcar. El bagazo es el residuo fibroso que constituye el 12-14% del peso de la caña y es normalmente quemado para la producción de vapor y energía eléctrica (Nichols *et al*., 2008). Sin embargo, la conversión de bagazo en etanol permitiría aumentar su valor entre 2 y 6 veces mejorando la ecuación económica de la biorefinería (Tuck *et al*., 2012). El crecimiento de *E.coli* en bagazo como única fuente de carbono es el primer paso para alcanzar este objetivo. Aún queda por determinar cuánto etanol es posible producir a partir de esta materia prima cuando se introduce M9F1 en cepas etanologénicas como LY180.

Una estrategia alternativa en la que el potencial de M9F1 debe ser evaluado es formando parte de «consorcios simbióticos». En esta estrategia dos o más microorganismos cooperan para degradar y fermentar la materia prima. En estos consorcios existen microorganismos especializados en la sacarificación de la materia prima lignocelulósica y también microorganismos especializados en la fermentación de los azúcares liberados (Zuroff y Curtis, 2012). La capacidad de M9F1 para conferir el crecimiento en bagazo abre las puertas a esta alternativa.

Para que M9F1 pueda utilizarse en el marco de un proceso industrial es necesario aumentar significativamente los rendimientos de etanol obtenidos en este trabajo. Se debe tener en cuenta que M9F1 es un fragmento de ADN natural. Como tal, no está optimizado para expresar los genes relevantes para la degradación de lignocelulosa. De hecho, existen otros genes en M9F1 que seguramente no participan de este proceso. Por lo tanto, un primer paso para mejorar el rendimiento de la conversión de lignocelulosa en etanol es colocar los genes relevantes en un contexto genético adecuado para maximizar las funciones buscadas. De esta manera, se podrá mejorar su expresión y eliminar el material genético irrelevante.

En conclusión, además de generar un organismo capaz de convertir biomasa vegetal en etanol, el principal beneficio de este Proyecto ha sido el desarrollo y la validación de un proceso basado en la metagenómica funcional que permite obtener elementos genéticos novedosos de potencial aplicación agroindustrial. Este proceso puede emplearse para mejorar el organismo obtenido pero también para buscar funciones metabólicas que viabilicen otras bio-conversiones relevantes como ser grasas en biodiesel, glicerol en etanol, o vinazas ricas en proteínas en monómeros industriales como el estireno.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer muy especialmente al Dr. Lonnie Ingram y al Dr. Ismael Nieves de la Universidad de Florida en Gainesville (EE.UU.) por facilitarnos gentilmente la cepa LY180 y el plásmido pLOI297 así como también permitirnos utilizar sus laboratorios e instalaciones para llevar adelante algunos de los estudios que aquí se presentan. También queremos agradecer a la Lic. Daniella Senatore por su apoyo técnico en la construcción de las metagenotecas, a la Dra. Liliana Borzacconi y al M.Sc. Mauricio Passeggi por facilitarnos las muestras de lodos de los reactores anaerobios, a la Ing. Betiana Bouzas de Frigorífico Pando por la provisión de muestras de rumen y al Ing. Nikolai Guchin de ANCAP por proveernos bagacillo de caña de azúcar obtenido del ingenio azucarero de ALUR en Bella Unión (Artigas, Uruguay). Este trabajo fue financiado por el Proyecto INIA FPTA 2007-256. También contó con financiación de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Proyecto FSE 2009-23) y de PEDECIBA-Biología.

BIBLIOGRAFÍA

AAKVIK, T.; LALE, R.; LILES, M.; VALLA, S. 2011.Metagenomic Libraries for Functional Screening, p. 171-181. In F. de Bruijn (ed.), Handbook of Molecular Microbial Ecology I, First ed. John Wiley & Sons, Inc.

ALTERTHUM, F.; INGRAM, L. O. 1989. Efficient ethanol production from glucose, lactose, and xylose by recombinant *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology **55:**1943-1948.

CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. 2009. The Carbohydrate-Active En *Zymes database* (CAZy): an expert resource

for Glycogenomics. Nucleic Acids Res **37:**D233-8.

DESANTIS, T. Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E. L.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI, D.; HU, P.; ANDERSEN, G. L. 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. Appl Environ Microbiol **72:** 5069-72.

GEDDES, C. C.; NIEVES, I. U.; INGRAM, L. O. 2011. Advances in ethanol production. Curr Opin Biotechnol **22:**312-319.

HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDEN, G.; ZACCHI, G. 2006. Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today. Trends Biotechnol **24:**549-56.

HANDA, N.; TERADA, T.; DOI-KATAYAMA, Y.; HIROTA, H.; TAME, J. R.; PARK, S. Y.; KURAMITSU, S.; SHIROUZU, M.; YOKOYAMA, S. 2005. Crystal structure of a novel polyisoprenoid-binding protein from Thermus thermophilus HB8. Protein Sci **14:**1004-10.

HANDELSMAN, J. 2004. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **68:**669-685.

IEA. 2012. Tracking clean energy progress. OECD/IEA, Paris.

KHRAMTSOV, N., L. MCDADE, A. AMERIK, E. YU, K. DIVATIA, A. TIKHONOV, M. MINTO, G. KABONGO-MUBALAMATE, Z. MARKOVIC, M. RUIZ-MARTINEZ, AND S. HENCK. 2011. Industrial yeast strain engineered to ferment ethanol from lignocellulosic biomass. Bioresour Technol **102:**8310-3.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **35:**377-391.

METAGENOMICS, C. O. 2007. The new science of metagenomics: Revealing the secrets of our microbial planet. The National Academies Press, Washington, DC.

MILLER, E. N.; JARBOE, L. R.; YOMANO, L. P.; YORK, S. W.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. 2009. Silencing of NADPH-dependent oxidoreductase genes (yqhD and dkgA) in furfural-resistant ethanologenic Escherichia coli. Appl Environ Microbiol **75:**4315-23.

NICHOLS, N.; MONCEAUX, D.; DIEN, B.; BOTHAST, R. 2008. Prouduction of ethanol from corn and sugarcane, p. 3-15. *In* J. D. Wall, C. S. Harwood, and A. Demain (ed.), Bioenergy. ASM Press, Washington, DC.

OHTA, K.; BEALL, D. S.; MEJIA, J. P.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. 1991. Metabolic engineering of Klebsiella oxytoca M5A1 for ethanol production from xylose and glucose. Appl Environ Microbiol **57:**2810-5.

RAPPE, M. S.; GIOVANNONI, S. J. 2003. The uncultured microbial majority. Annu Rev Microbiol **57:**369-94.

SIEBER, J. R.; SIMS, D. R.; HAN, C.; KIM, E.; LYKIDIS, A.; LAPIDUS, A. L.; MCDONNALD, E.; ROHLIN, L.; CULLEY, D. E.; GUNSALUS, R.; MCINERNEY, M. J. 2010. The genome of Syntrophomonas wolfei: new insights into syntrophic metabolism and biohydrogen production. Environ Microbiol **12:** 2289-301.

SIMON, C.; DANIEL, R. 2009. Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. Appl Microbiol Biotechnol **85:**265-76.

STANCIK, L. M.; STANCIK, D. M.; SCHMIDT, B.; BARNHART, D. M.; YONCHEVA, Y. N.; SLONCZEWSKI, J. L. 2002. pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in Escherichia coli. J Bacteriol **184:** 4246-58.

SUN, S.; CHEN, J.; LI, W.; ALTINTAS, I.; LIN, A.; PELTIER, S.; STOCKS, K.; ALLEN, E. E.; ELLISMAN, M.; GRETHE, J.; WOOLEY, J. 2011. Community cyberinfrastructure for Advanced Microbial Ecology Research and Analysis: the CAMERA resource. Nucleic Acids Res **39:**D546-51.

TANS, P.; KEELING, R. 2012, posting date. Trends in carbon dioxide. NOAA/ESRL (http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/). [Online.]

TUCK, C. O.; PÉREZ, E.; HORVÁTH, I. T.; SHELDON, R. A.; POLIAKOFF, M. 2012. Valorization of Biomass: Deriving More Value from Waste. Science **337:**695-699.

ZUROFF, T.; CURTIS, W. 2012. Developing symbiotic consortia for lignocellulosic biofuel production. Applied Microbiology and Biotechnology **93:**1423-1435.