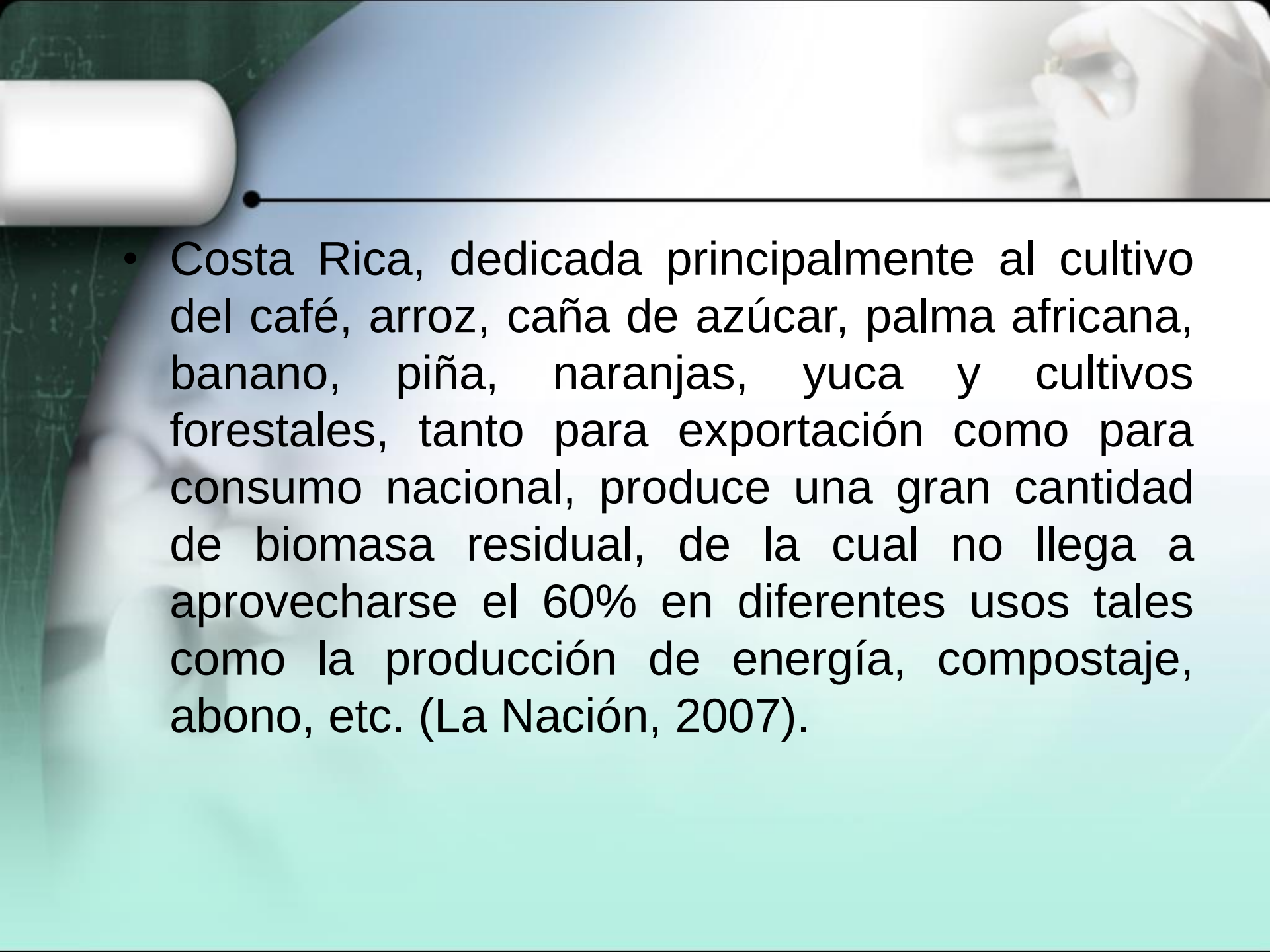


Producción de bioetanol con microorganismos genéticamente modificados y cepas mutantes a partir de celulosa y lignina.

Virginia Montero , Ph.D
Alejandro Hernández, MSc
Roger Moya, Ph.D
Ricardo Coy, MGA

Instituto Tecnológico de Costa Rica

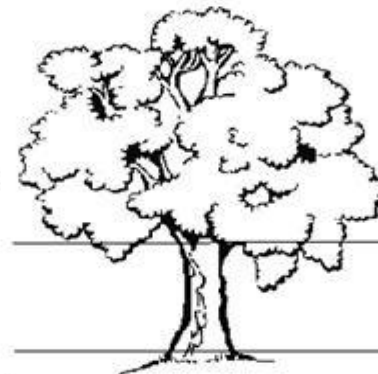
- 
- Costa Rica, dedicada principalmente al cultivo del café, arroz, caña de azúcar, palma africana, banano, piña, naranjas, yuca y cultivos forestales, tanto para exportación como para consumo nacional, produce una gran cantidad de biomasa residual, de la cual no llega a aprovecharse el 60% en diferentes usos tales como la producción de energía, compostaje, abono, etc. (La Nación, 2007).

Situación de los residuos en Costa Rica



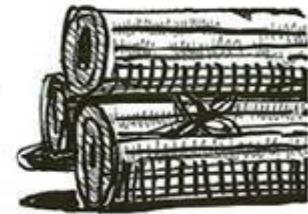
Volumen total en pie (%)

30%	100
60%	100
promedio	100



Volumen comercial en pie (%)

55,13
59,40
57,27



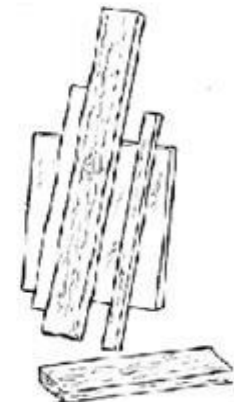
Volumen en troza (%)

52,01
46,15
49,08



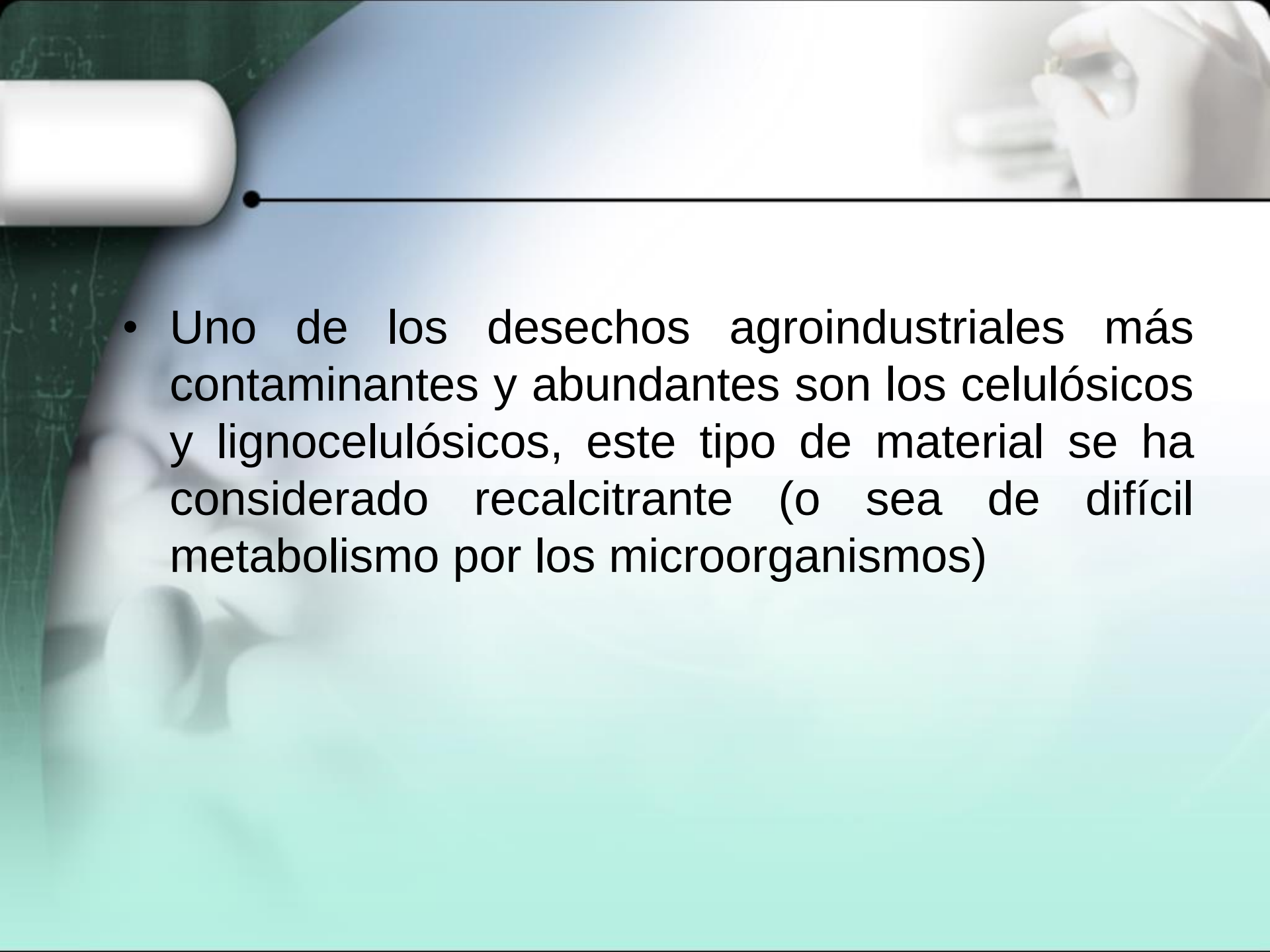
Volumen en bloque (%)

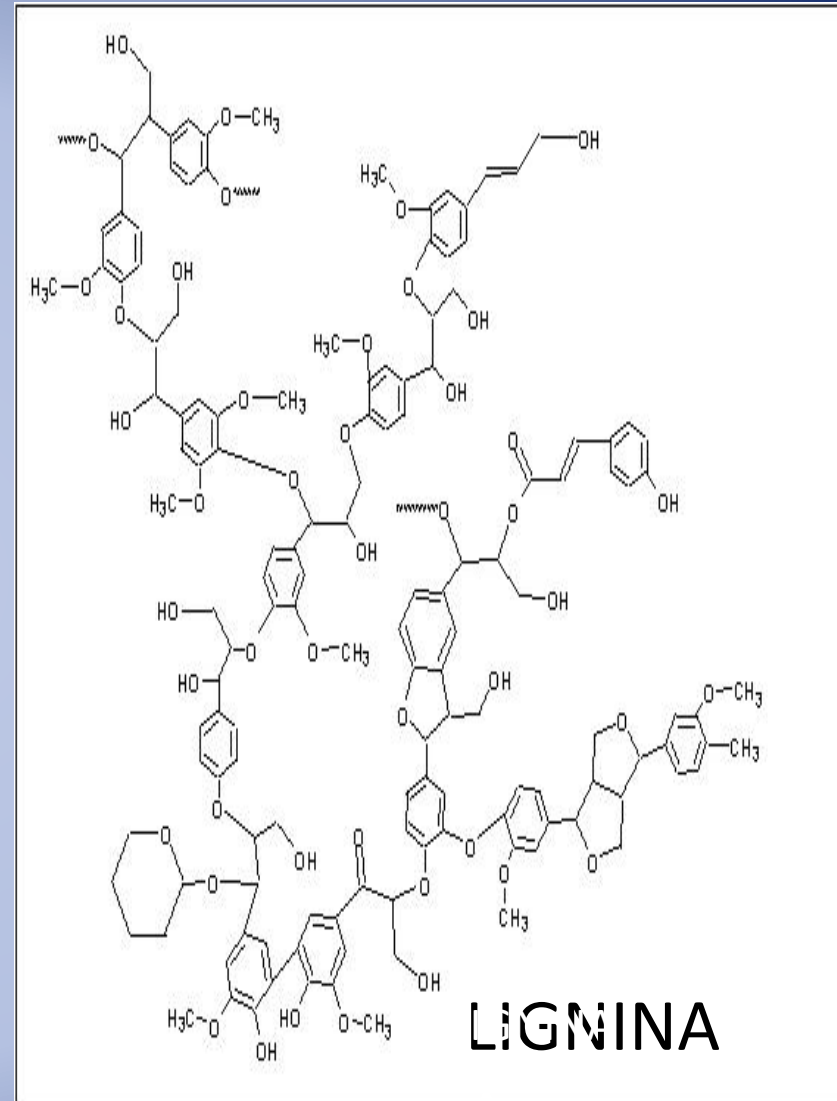
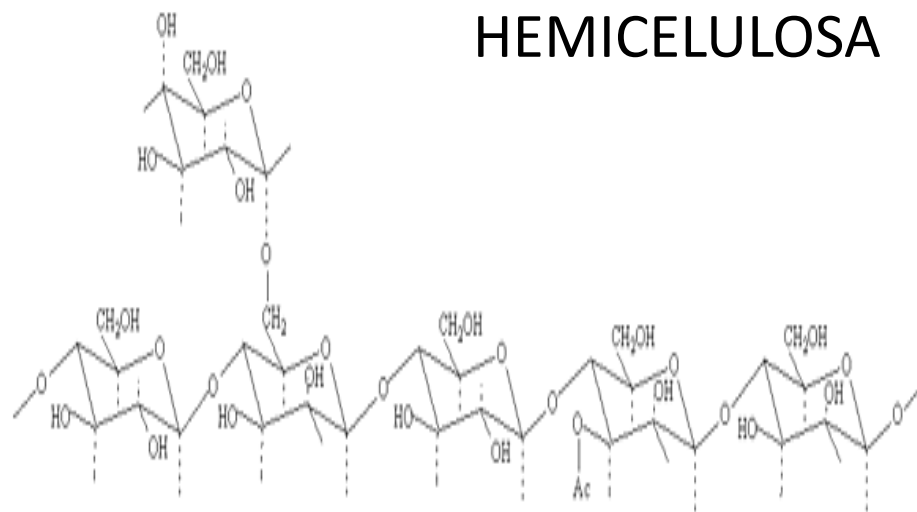
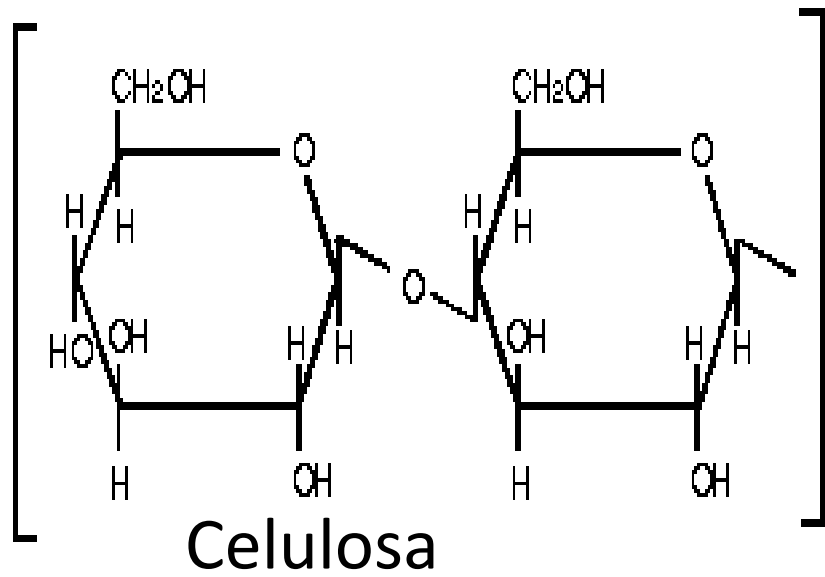
28,66
24,22
26,44



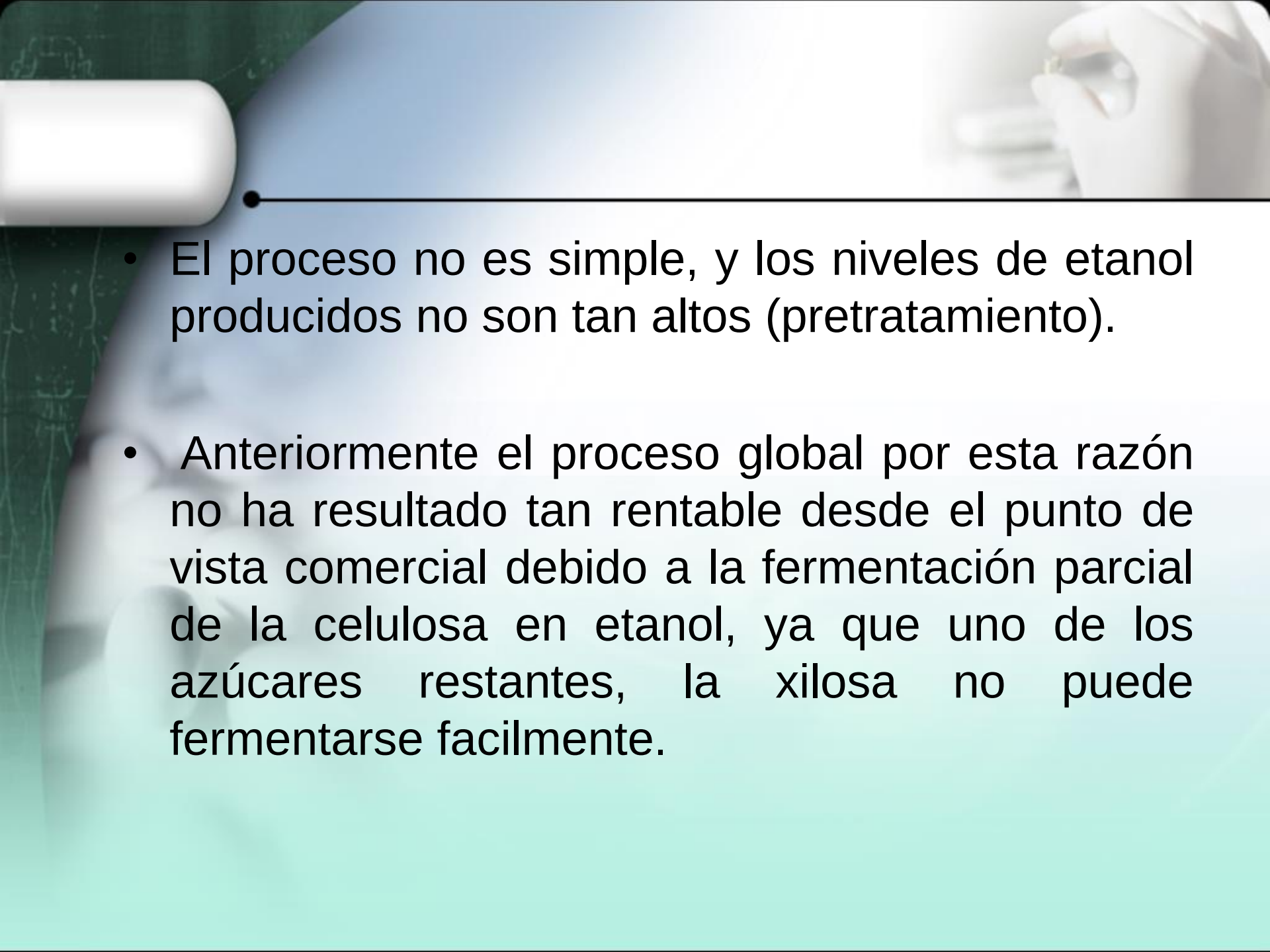
Volumen aserrado (%)

23,89
20,56
22,23

- 
- Uno de los desechos agroindustriales más contaminantes y abundantes son los celulósicos y lignocelulósicos, este tipo de material se ha considerado recalcitrante (o sea de difícil metabolismo por los microorganismos)



A

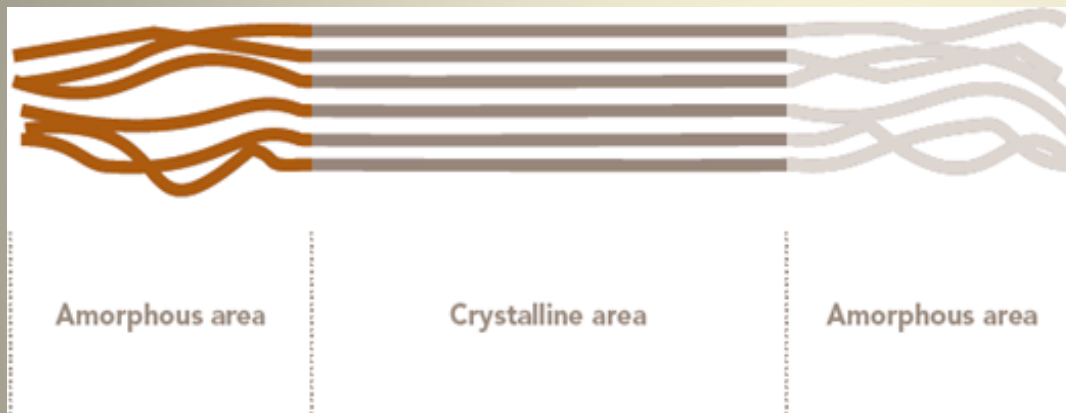
- 
- El proceso no es simple, y los niveles de etanol producidos no son tan altos (pretratamiento).
 - Anteriormente el proceso global por esta razón no ha resultado tan rentable desde el punto de vista comercial debido a la fermentación parcial de la celulosa en etanol, ya que uno de los azúcares restantes, la xilosa no puede fermentarse fácilmente.

Determinación de las especies a utilizar

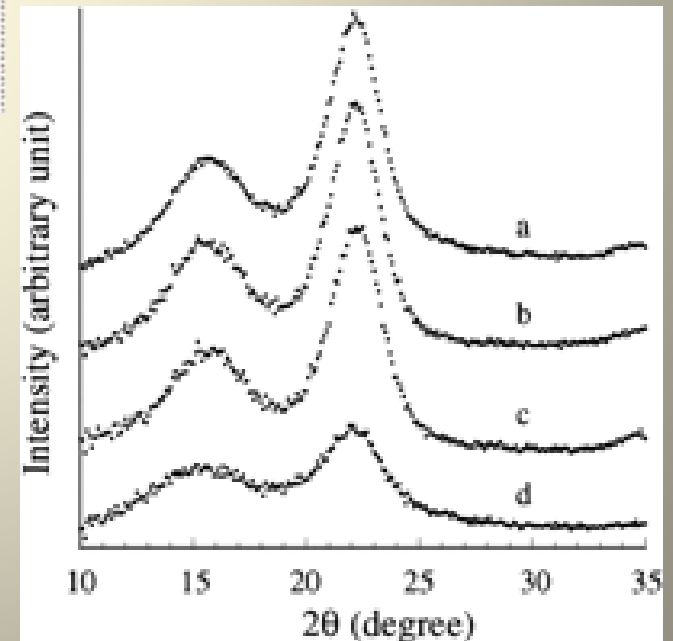
- Tres especies se usan intensivamente en Costa Rica para producción de madera: melina (*Gmelina arborea*), teca (*Tectona grandis*) y Acacia (*Acacia mangium*)



- Cristalidad de la madera: grado de accebilidad de celulosa



- Medición:



Estrategia del proyecto

- Uno de los factores que se ha descrito como un problema en la fermentación de la xilosa es la carencia de la proteína transportadora correspondiente en levaduras fermentadoras, por lo que el proyecto propuso la posibilidad de mejorar por ingeniería genética la levadura de tal manera que contiene un gen transportador y enzimas específicas.
- Todos estos en un mismo vector y utilizando la estrategia de plásmidos de integración (Yeast Integrating Plasmids (YIp),

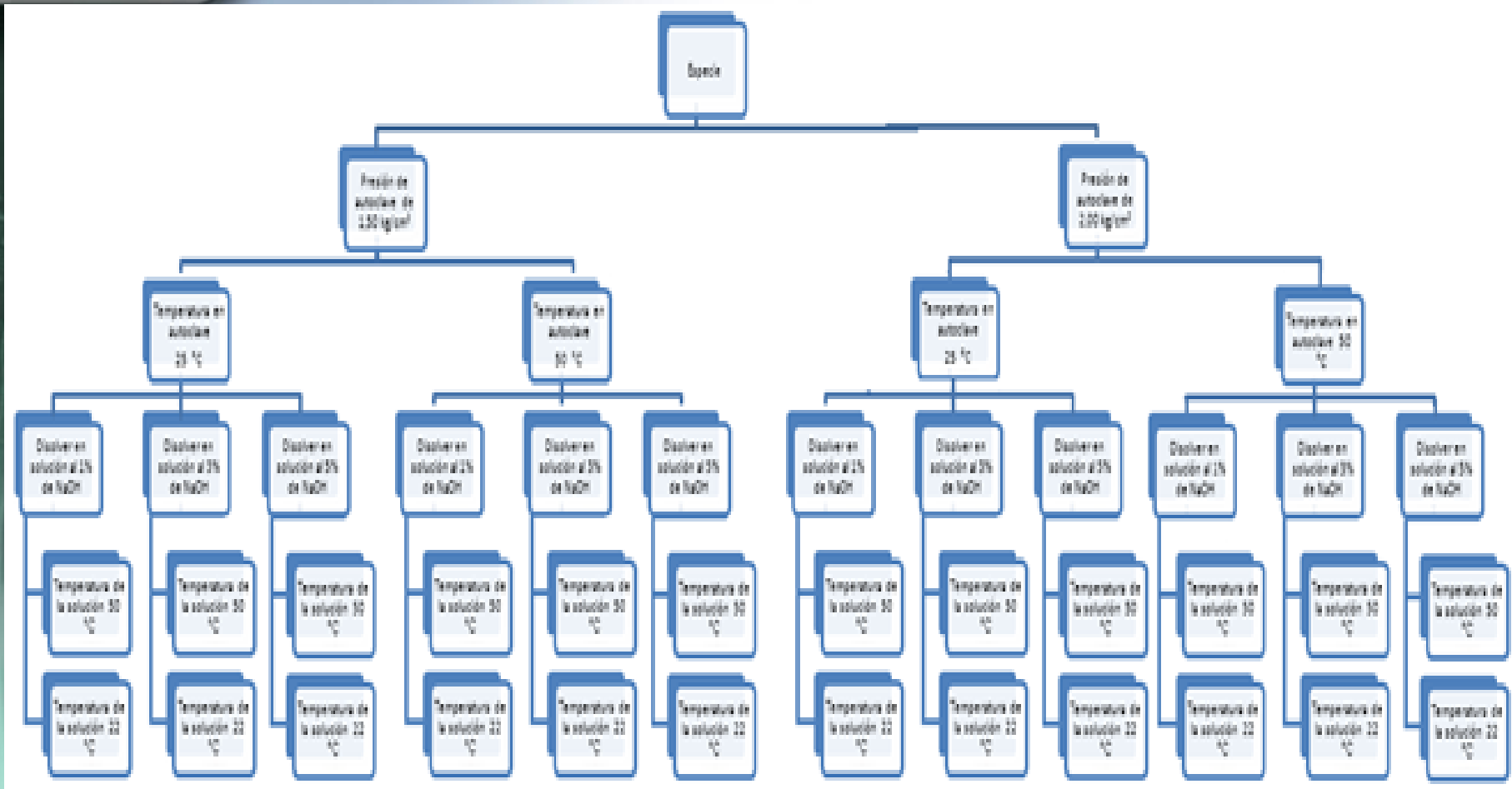
Primeramente Caracterización de la especie

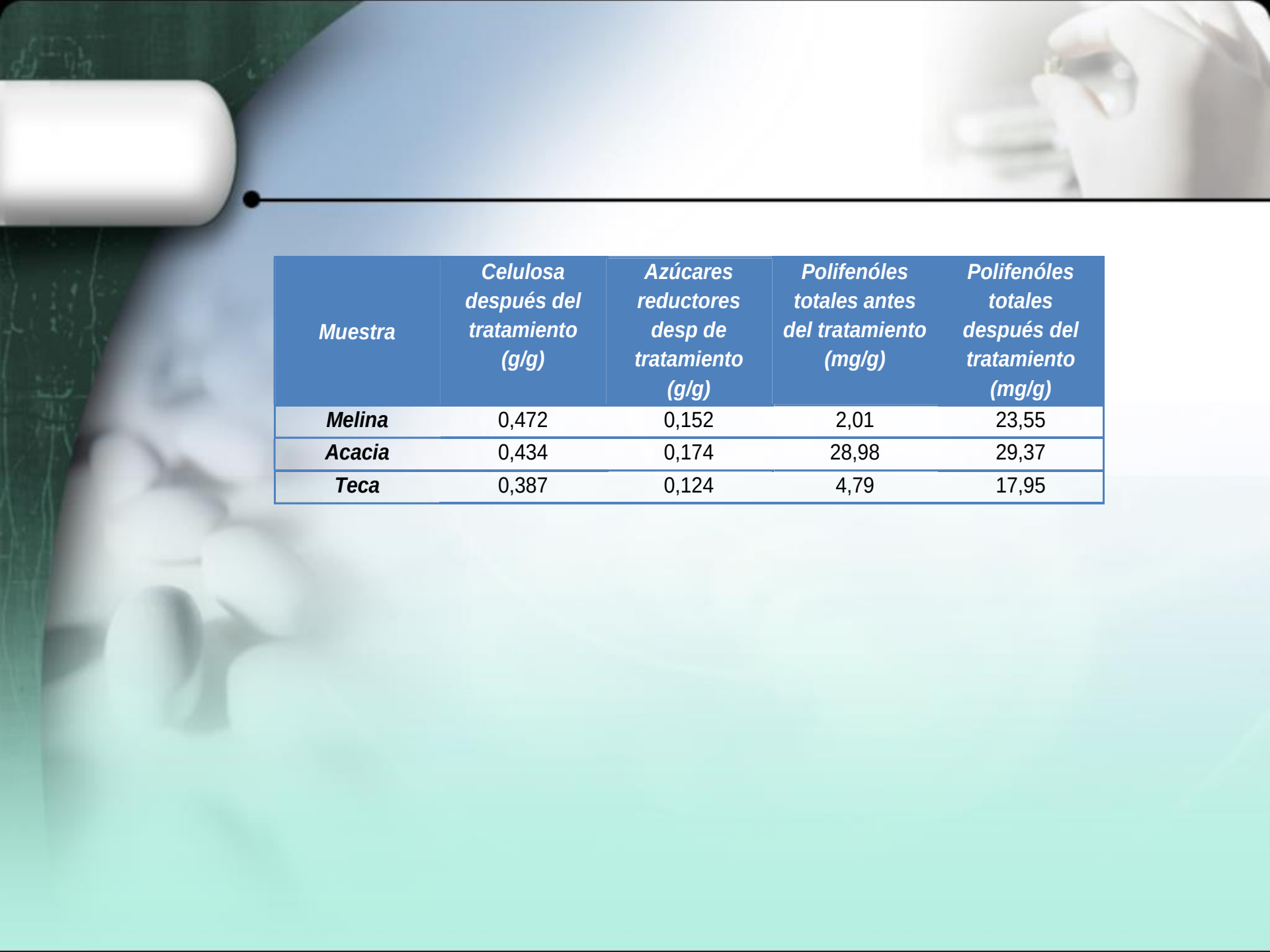
- Hasta ahora se han caracterizado físico-químicamente estas especies:

Propiedad de la madera	<i>Acacia mangium</i>	<i>Gmelina arborea</i>	<i>Tectona grandis</i>
Holocelulosa (%)	64,19	60,38	59,65
Lignina (%)	21,42	25,56	30,91
Cenizas (%)	0,582	1,07	0,78
Sílice (ppm)	0,00	9,20	-
Solubilidad hidróxido de sodio al 1% (%)	13,21	26,13	11,98
Solubilidad en agua caliente (%)	2,45	8,97	3,13
Solubilidad agua fría (%)	2	7,81	3,28
Solubilidad Diclorometano (%)	3,25	2,21	2,20
Solubilidad Etanol-Tolueno (%)	0,95	0,82	1,18

Pretratamiento

- Disminuir el grado de cristalinidad de la madera.
- Se empezó a trabajar con NaOH en 3 concentraciones, en 3 tiempos y 3 temperaturas.
- Paralelo se utilizó un hongo celulolítico que trabaja con una temperatura entre 50 °C y 55 °C.





<i>Muestra</i>	<i>Celulosa después del tratamiento (g/g)</i>	<i>Azúcares reductores desp de tratamiento (g/g)</i>	<i>Polifenóles totales antes del tratamiento (mg/g)</i>	<i>Polifenóles totales después del tratamiento (mg/g)</i>
Melina	0,472	0,152	2,01	23,55
Acacia	0,434	0,174	28,98	29,37
Teca	0,387	0,124	4,79	17,95

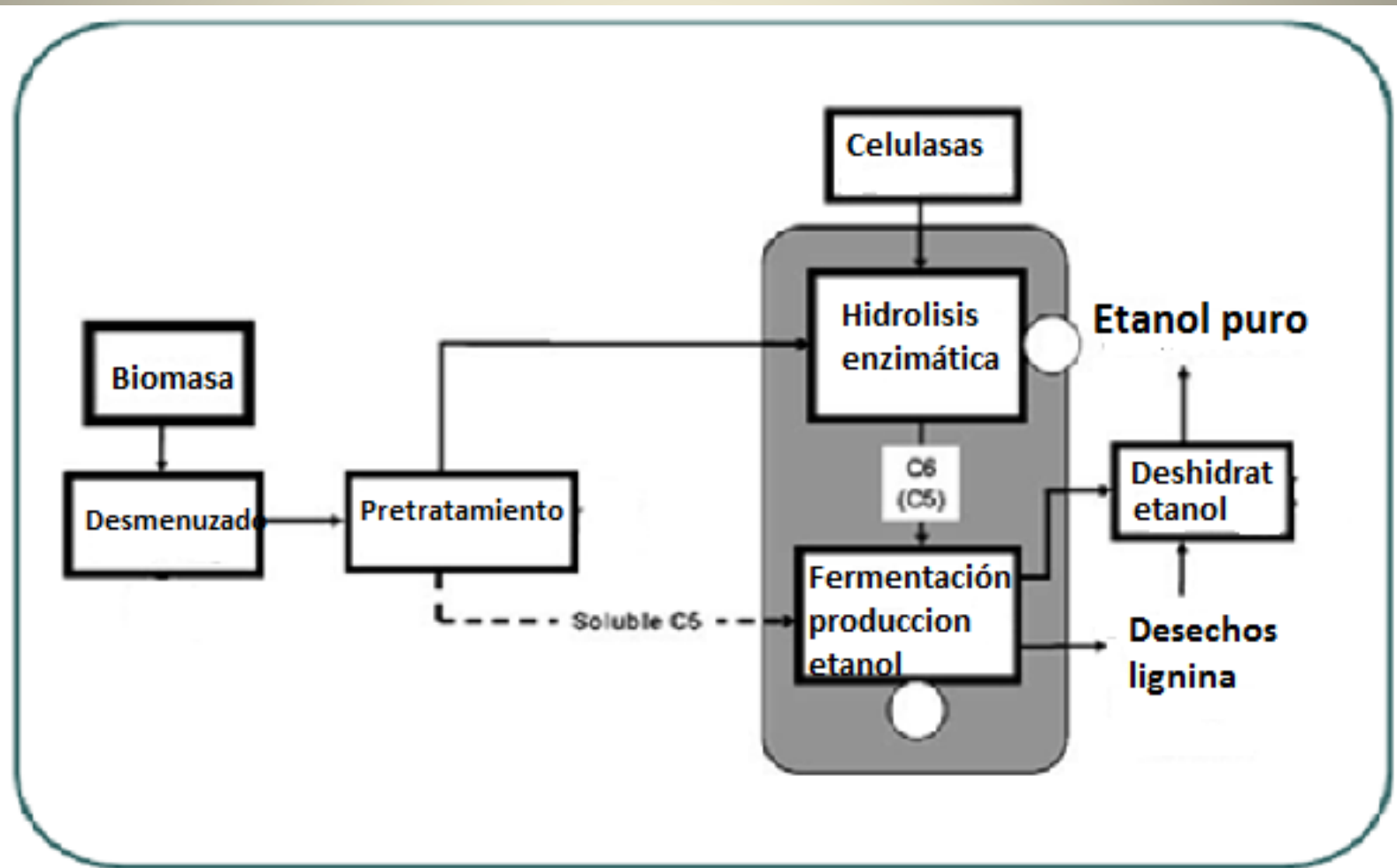
Pretratamiento

Madera	Fuente de calor		
	Autoclave H_2SO_4 (g/10g)	Autoclave Agua destilada (g/10g)	Plantilla baño maría (g/10g)
Melina	0,362	0,126	0,232

Acido sulfúrico (%)	Tiempo en autoclave (minutos)	Azucares reductores disponibles en 5 g (g)
1	10	0,3839
1	15	0,4630
4	10	0,5959
4	15	0,6102
1	25	0,353

Parámetro	DÍA 3 (reposo)		DÍA 4 (reposo)		DÍA 5 (reposo)	
°Brix	20,4	18,1	14,7	20,1	15,1	19,5
Índice Refracción	1,3647	1,3607	1,3552	1,3640	1,3553	1,3631
Poder calórico (cal/g)	4998,88	4230,11	1621,31	Pendiente	1955,05	3426,34
Volumen (mL)	2,5	4,6	11,0	9,0	15,0	9,0
Concentración etanol (% v/v)	87,5	70,7	46,8	87,5	47,1	87,5
Volumen real etanol en destilado (mL)	2,188	3,252	5,148	7,895	7,065	7,875
(Volumen * Cn etanol)						
Promedio masa etanol (g)	2,1596		5,1701		5,9312	
Rendimiento	0,18 g etanol/ g glucosa		0,43 g etanol/ g glucosa		0,49 g etanol/ g glucosa	

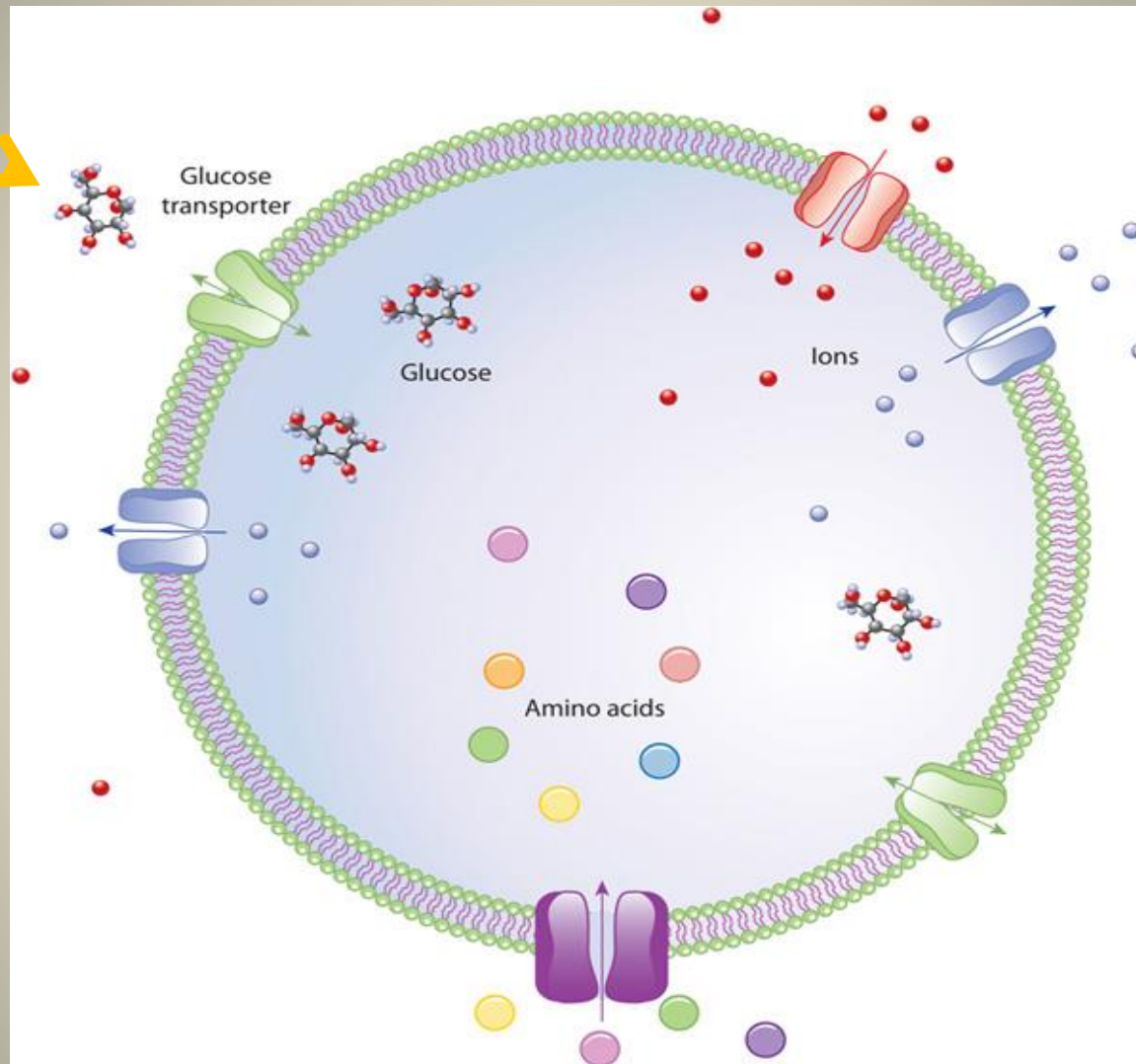
Proceso global



Mejoramiento genético de la levadura para metabolizar xilosa

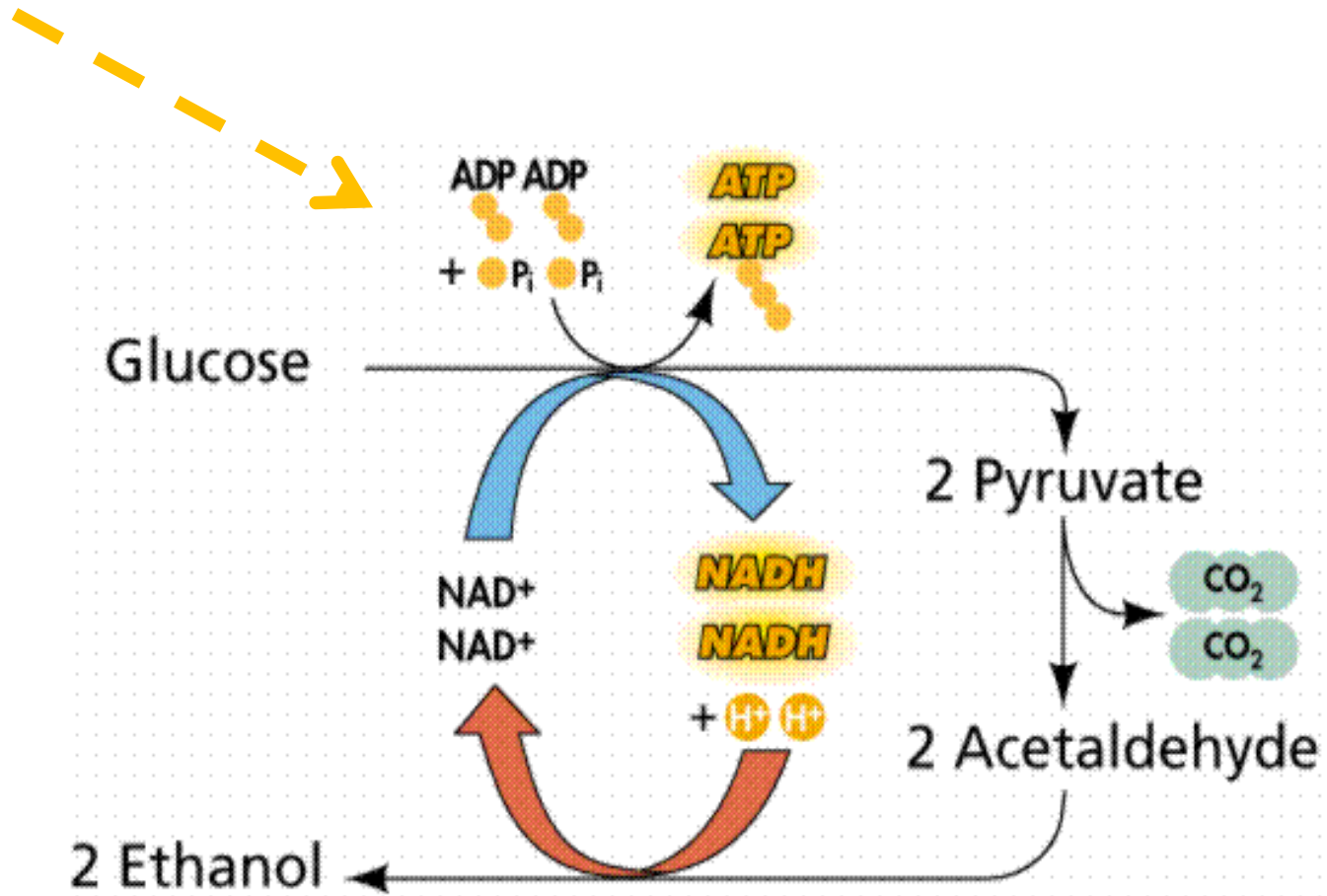


PRINCIPIOS BÁSICOS



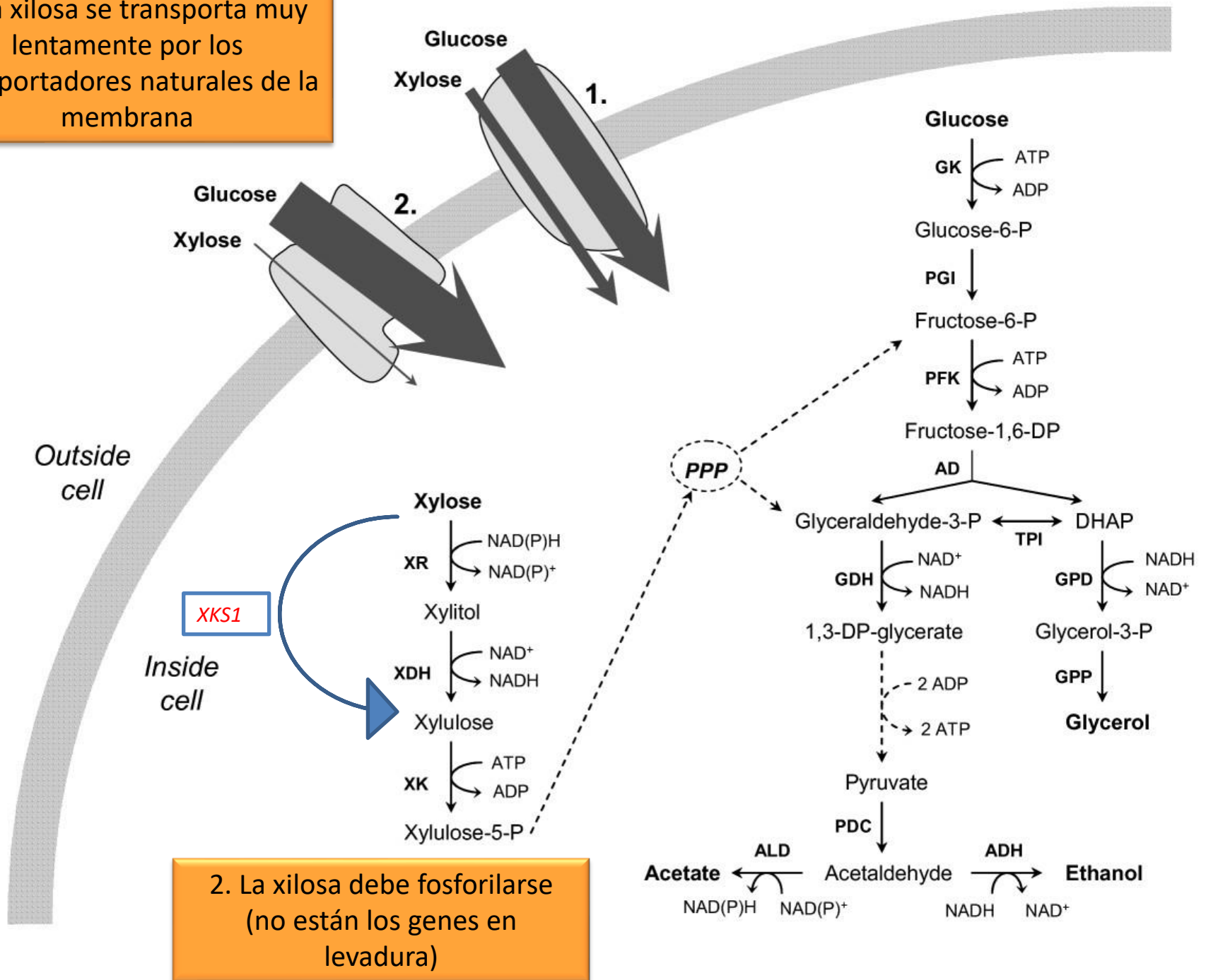
Los azúcares, los aminoácidos, iones se transportan hacia dentro de la célula gracias a **transportadores de membrana**

PRINCIPIOS BÁSICOS



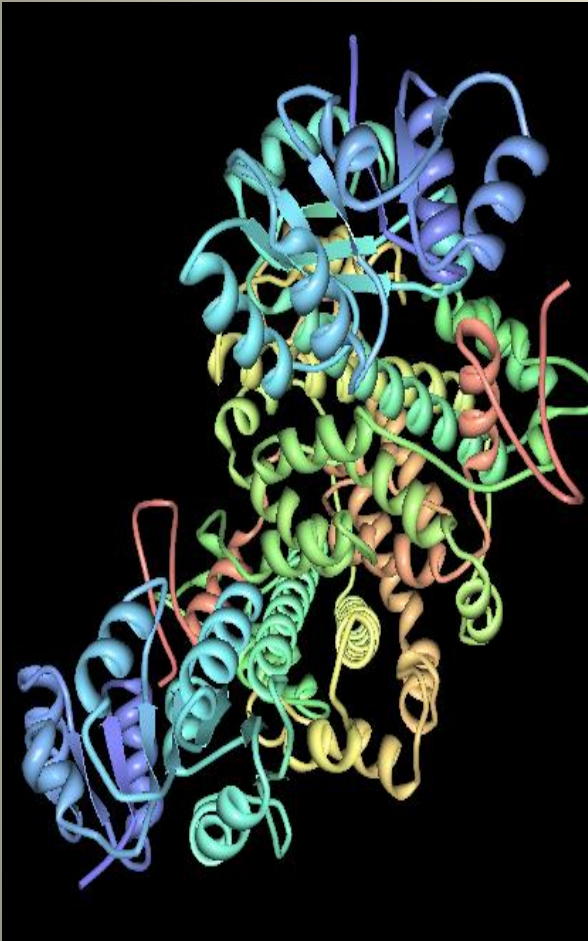
Los azúcares deben **fosforilarse** para entrar en la ruta metabólica de síntesis de ETANOL

1. La xilosa se transporta muy lentamente por los transportadores naturales de la membrana



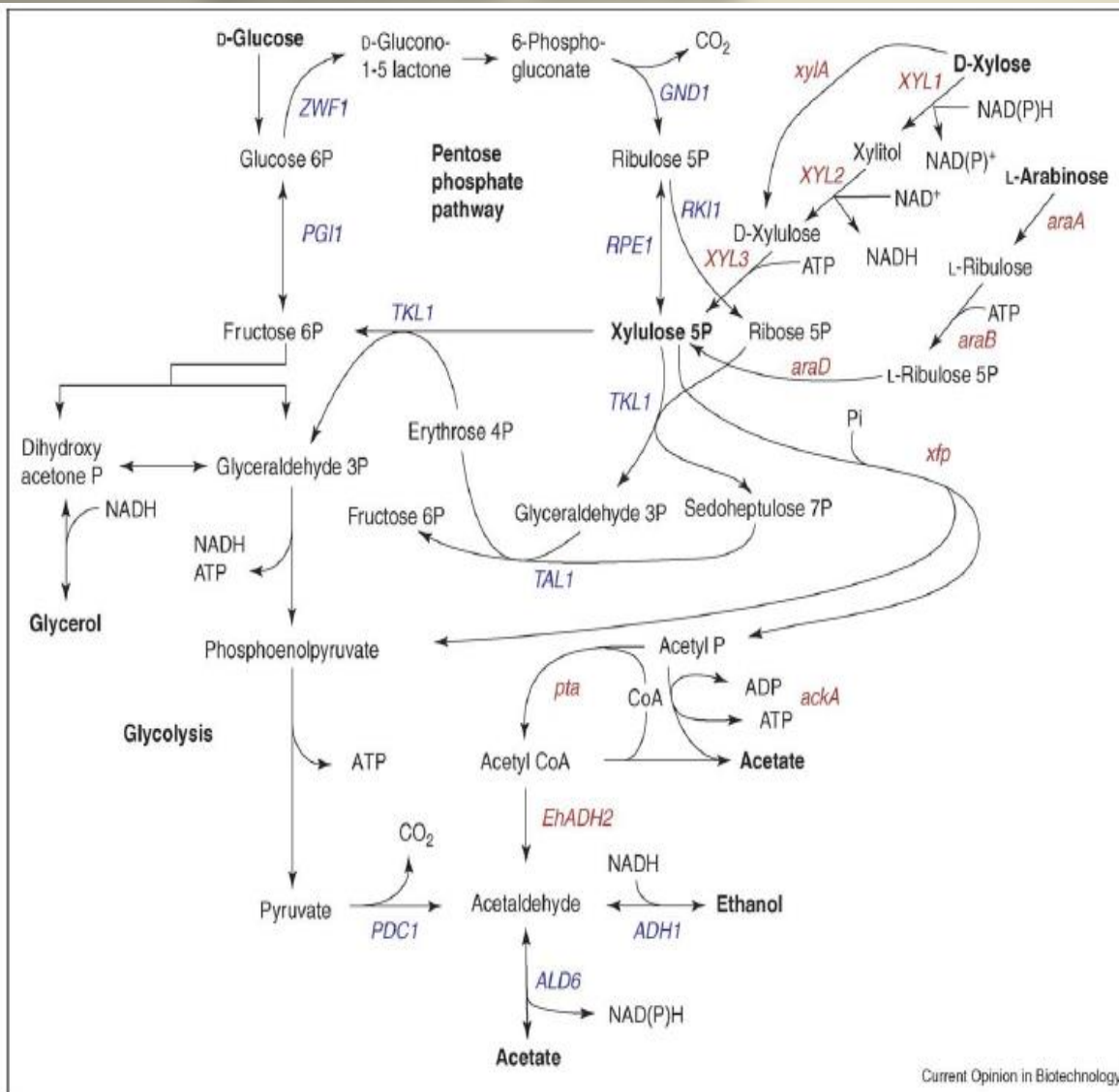
2. La xilosa debe fosforilarse (no están los genes en levadura)

Transportador de Xilosa

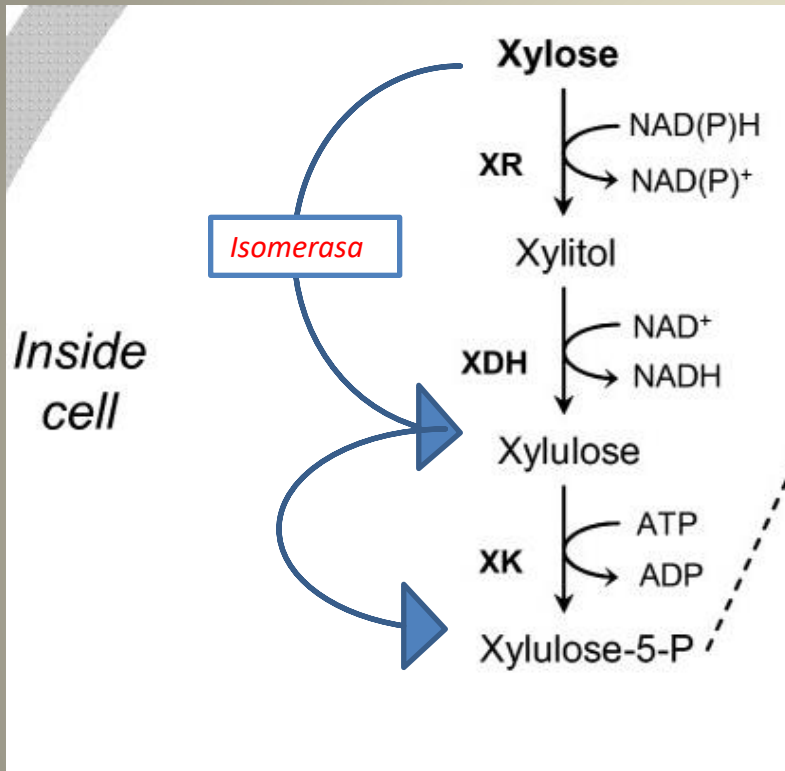


- Se dispone de un transportador facilitador tipo 1 glucose/xylose
- Es 10 veces más afin a la xilosa que a la glucosa
- Origen: Candida
- La xilosa se transporta eficientemente hacia el interior de la levadura

Ingeniería genética de levadura para procesar xilosa



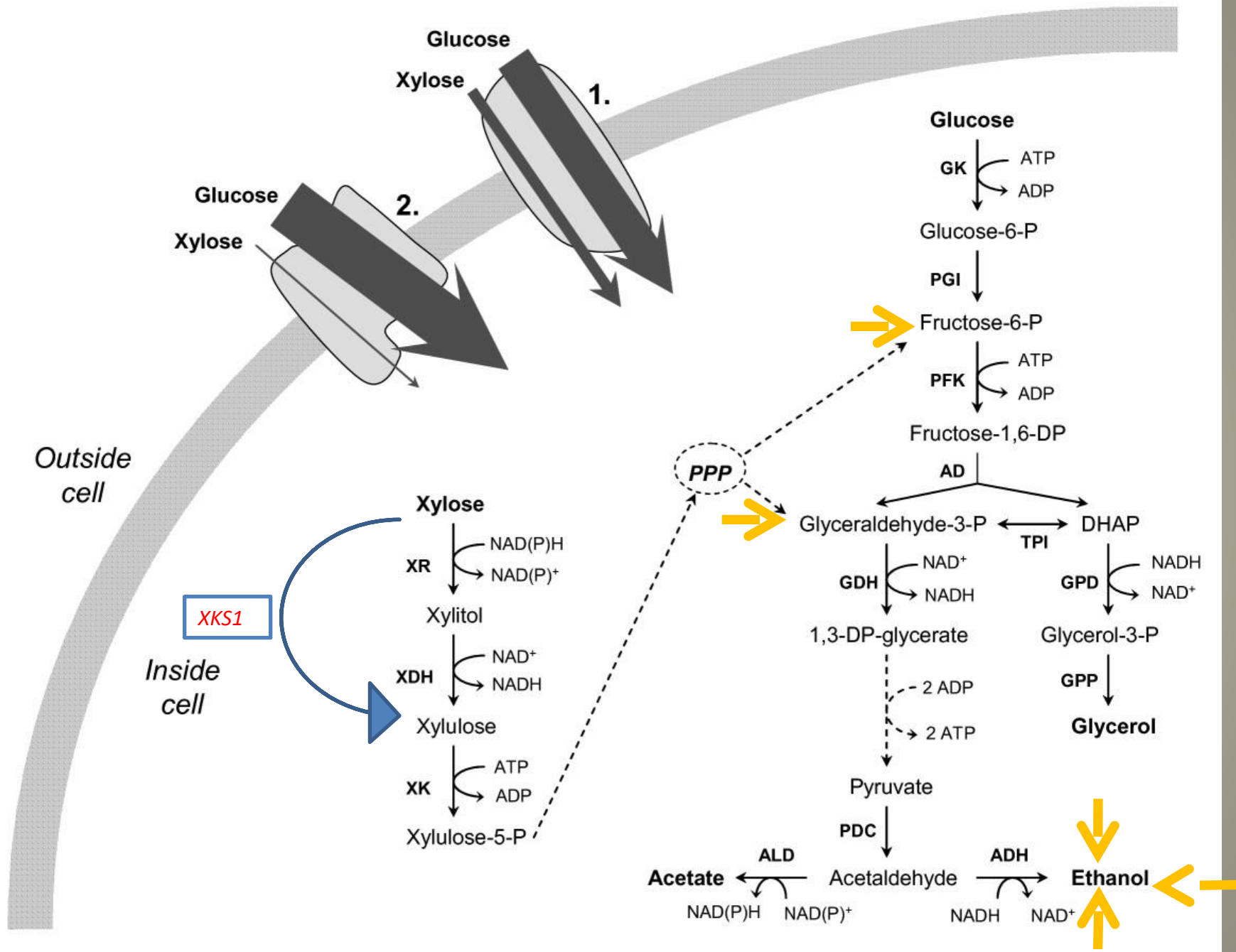
- Todos en un mismo vector utilizando la estrategia de plásmidos de integración (Yeast Integrating Plasmids YIp).

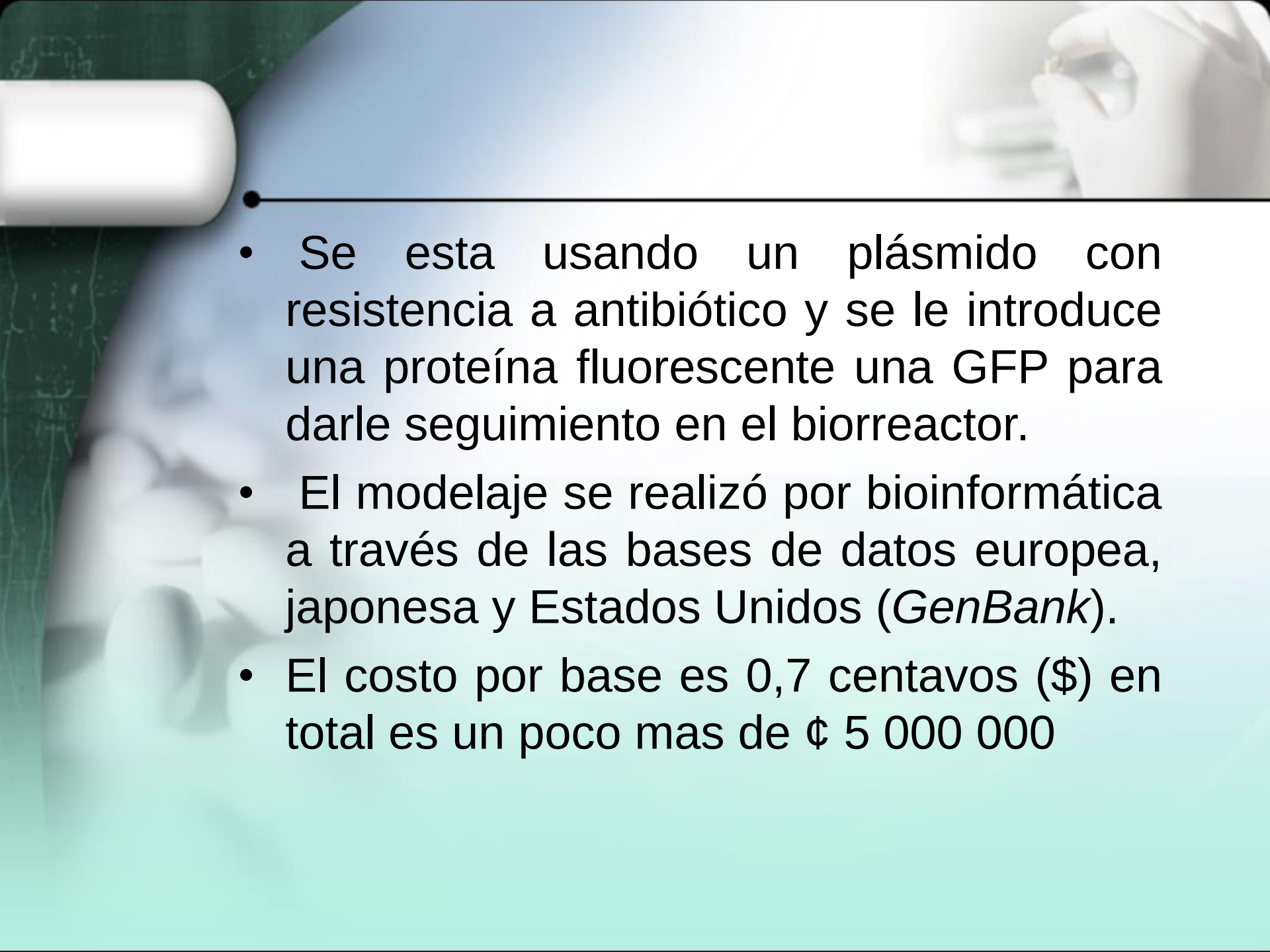


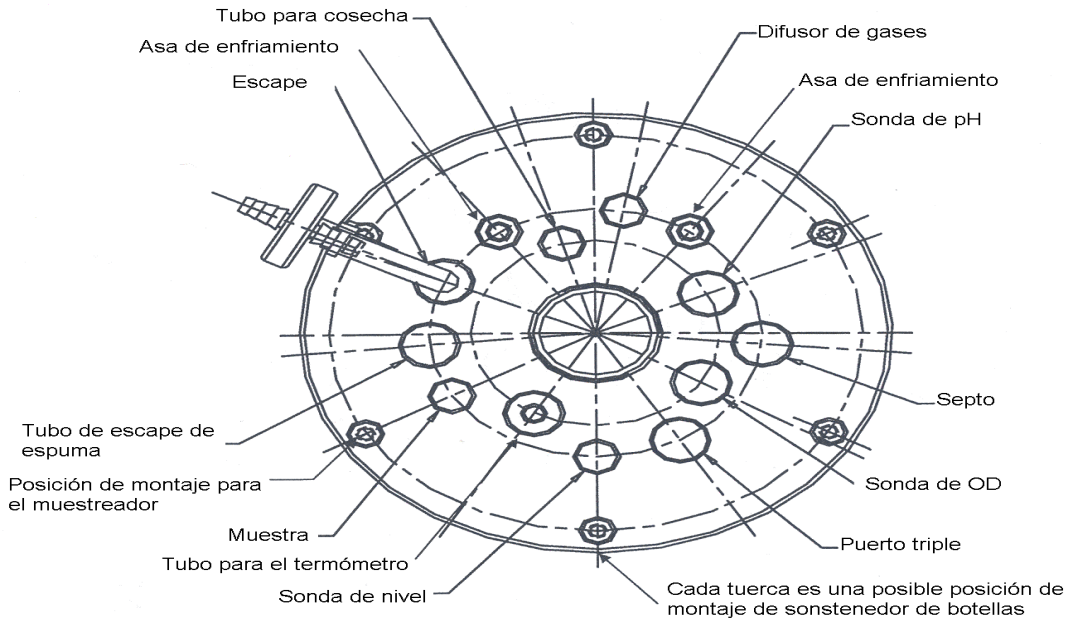
Problema: La alta expresión de XR y XDH hace que se consuma el NADP y el NAD

Problema: La alta expresión de XK hace que se consuma el ATP

- Se seleccionó una enzima capaz de realizar la conversión directa de Xylosa a Xylulosa
- Se analizarán distintos Promotores con el gen XK



- 
- Se esta usando un plásmido con resistencia a antibiótico y se le introduce una proteína fluorescente una GFP para darle seguimiento en el biorreactor.
 - El modelaje se realizó por bioinformática a través de las bases de datos europea, japonesa y Estados Unidos (*GenBank*).
 - El costo por base es 0,7 centavos (\$) en total es un poco mas de ¢ 5 000 000





**Grupo de investigación Proyecto
Bioetanol**