



# IDENTIFICACIÓN DE CELULASAS PARA LA PRODUCCION DE BIOETANOL DESDE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

Oriana Salazar

Alejandra Guerrero, M. Elena Lienqueo  
Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología  
Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas,  
Universidad de Chile

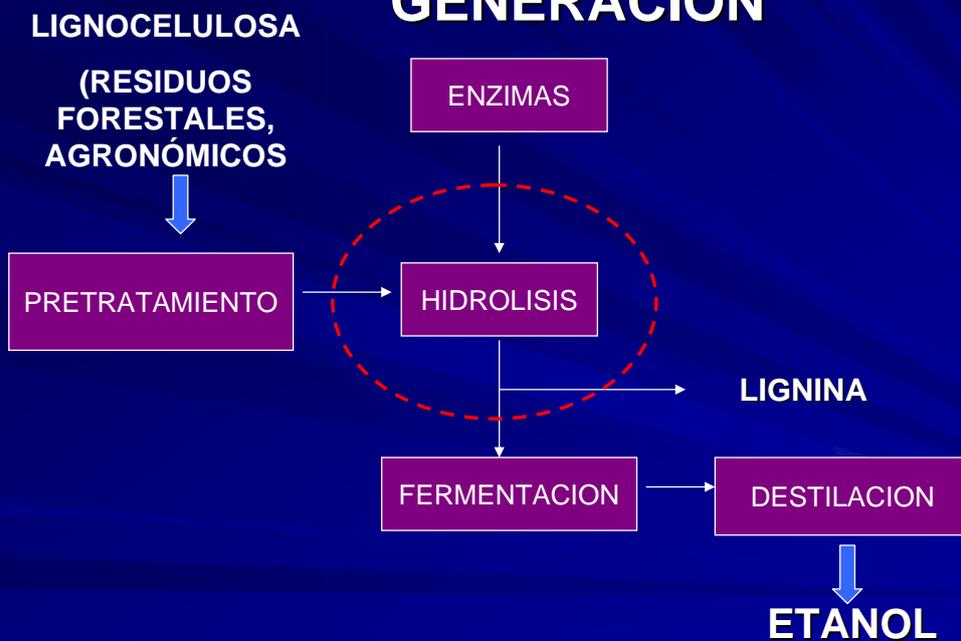
II Congreso Latinoamericano de Biorefinerías  
3-6 de Mayo 2009  
Concepción, Chile

# En esta presentación...

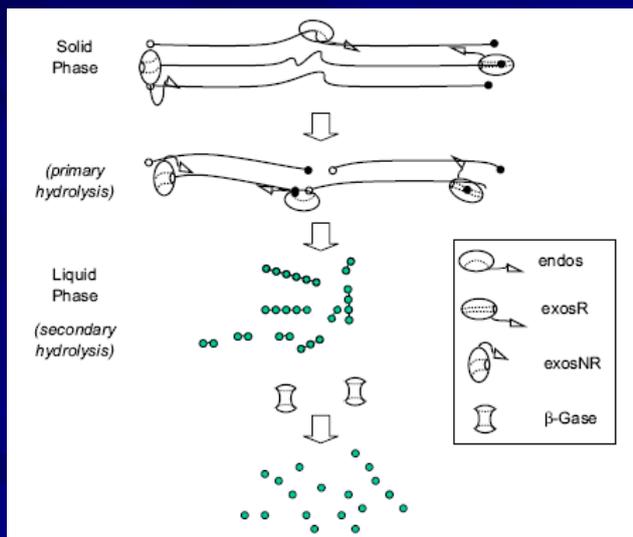


- Bioetanol de segunda generación
- Hidrólisis de celulosa
- Enzimas que hidrolizan celulosa
- Requisitos y limitaciones de estas celulasas
- Objetivos
- Estrategia experimental
- Resultados
- Resumen y conclusiones

# PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACION



# ¿Cómo ha solucionado la naturaleza el problema de la degradación de celulosa?



Endo glucanasas

Exoglucanasas

Celobiasas

# Microorganismos productores



## ■ Hongos

- Enzimas solubles,
- Endoglucanasas, exoglucanasas, y celobiasas.
- Buenos productores, enzimas de baja actividad

## ■ Bacterias

- Enzimas- endo, exoglucanasas y otras - físicamente asociadas en complejos multienzimáticos (celulosomas)
- Otras bacterias producen enzimas solubles
- Mayor actividad enzimática, baja producción

## ¿Qué esperamos de estas enzimas?

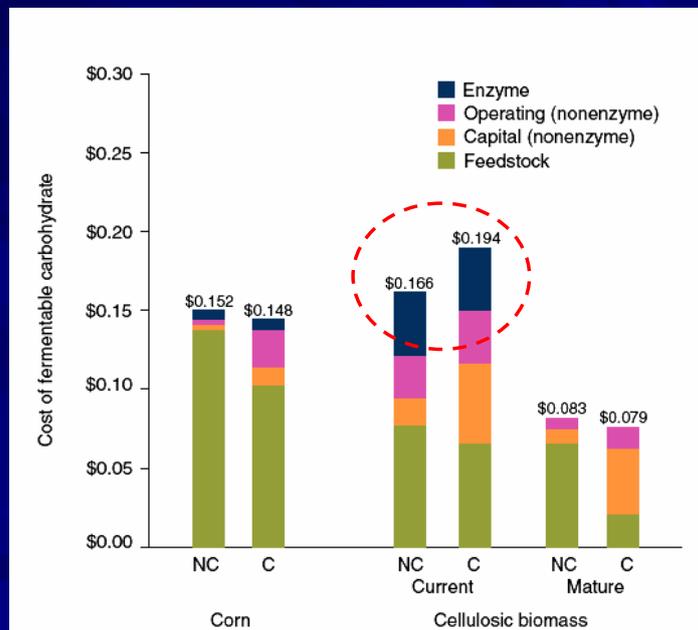


- Alta actividad catalítica
- Estabilidad
- Alta afinidad por celulosa
- Baja adsorción inespecífica a lignina

Sin embargo, a pesar de muchos avances, estas enzimas son aún ineficientes:

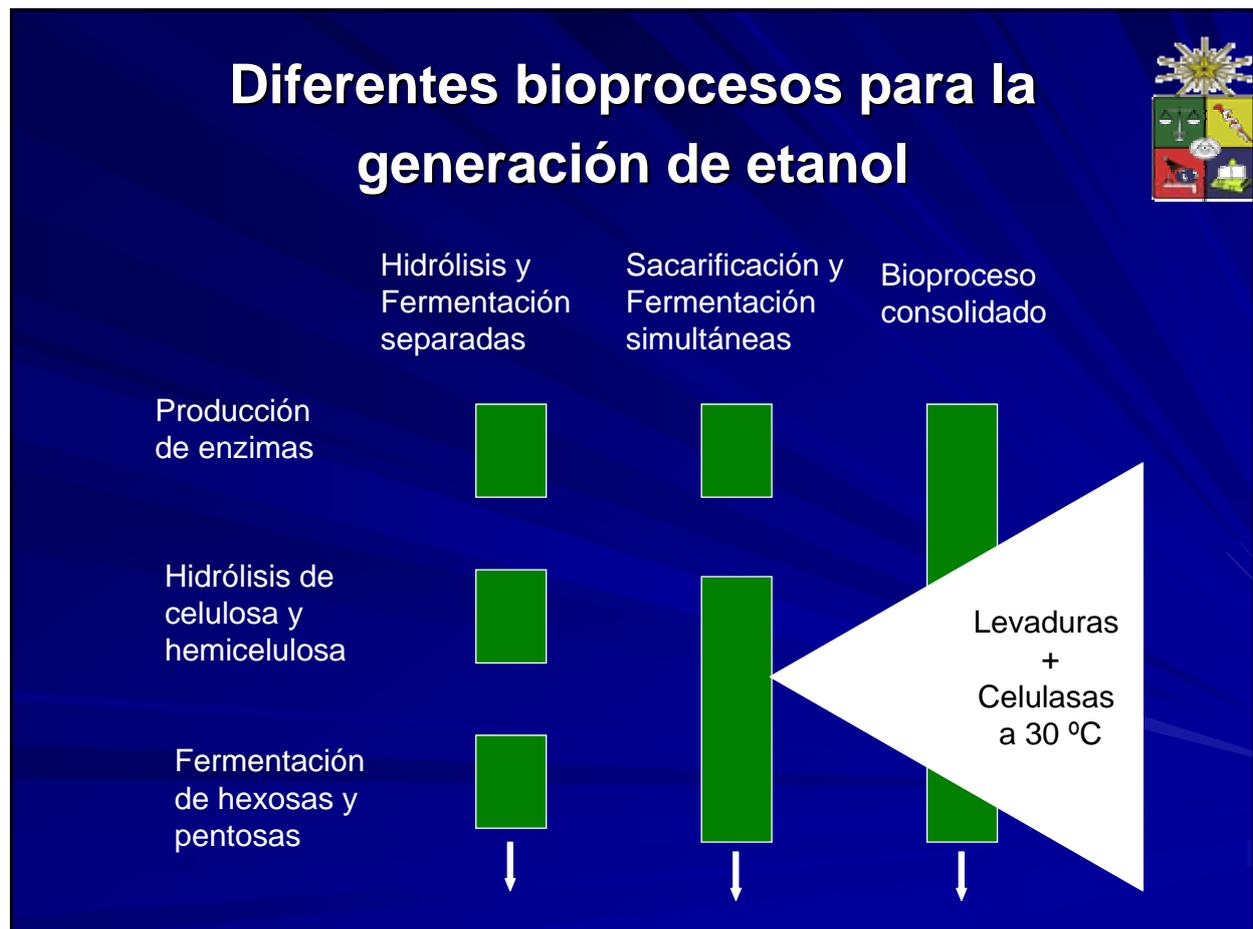
- Baja actividad catalítica
- Estabilidad baja en relación a los tiempos de residencia requeridos
- Inhibición por producto
- Temperaturas de operación son altas (~ 50 °C)
- Altos costos para el uso a gran escala

# Las enzimas para la hidrólisis inciden fuertemente en el costo total del proceso



From: Lynd et al. (2008). Nature Biotechnology 26, 169-172.

# Diferentes bioprocesos para la generación de etanol

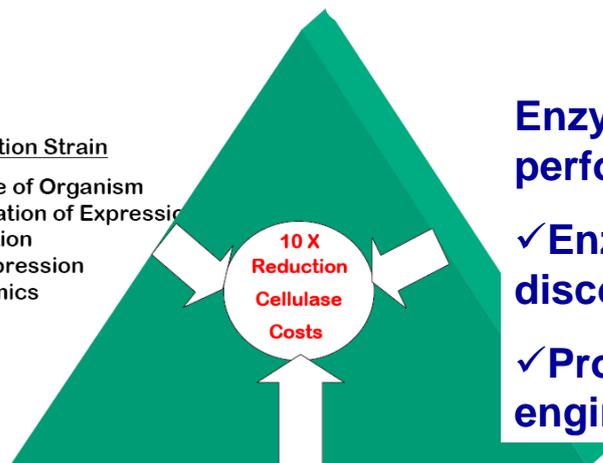


# Reducción de costos de celulasas



## Production Strain

- Choice of Organism
- Regulation of Expression
- Induction
- De-repression
- Genomics



**Enzyme performance**

✓ **Enzyme discovery**

✓ **Protein engineering**

## Production Process

- Host Engineering
- Fermentation Process Development
- Breakthrough Production Economics
- Product Recovery Manufacturing Economics of Scale

# OBJETIVO



- Identificar celulasas capaces de hidrolizar eficientemente celulosa a temperatura ambiente (20 - 25 °C), compatibles con procesos de SSF.
- Estabilizar dichas enzimas mediante estrategias de ingeniería de enzimas

# Estrategia experimental



Territorio  
Antártico Chileno



Screening de bacterias  
productoras de celulasas

*Pseudoalteromonas* sp A8

DNA  
recombinante

Gen de CelA8

CelA8

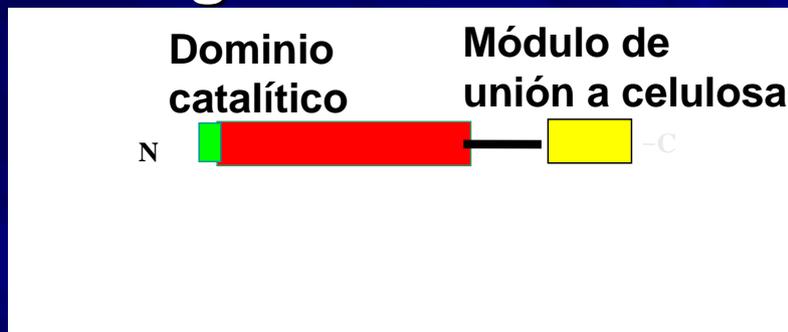


- ✓ Purificación
- ✓ Caracterización
- ✓ Mejorar función por mutagénesis e ingeniería de proteínas

clonación  
del gen  
celA8

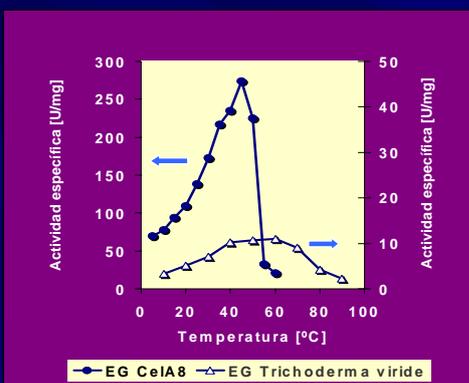
*E. coli* productora de  
celulasa A8

# Resultados: celA8 es una endoglucanasa modular



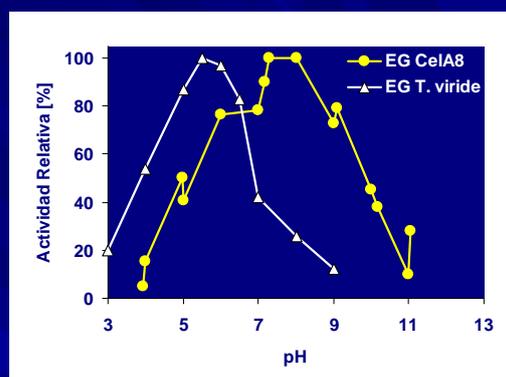
Cuantificación de la actividad endoglucanasa mediante hidrólisis de Carboximetil celulosa (CMC) y análisis de extremos reductores con DNS

# Resultados: Caracterización de celA8



CelA8, 30 veces mayor actividad específica sobre CMC que EG de *T. viridae*

CelA8 exhibe temperatura óptima de actividad ~ 40°C, EG *T. viridae* 40 – 60 °C



Actividad óptima de celA8 pH 7 - 8

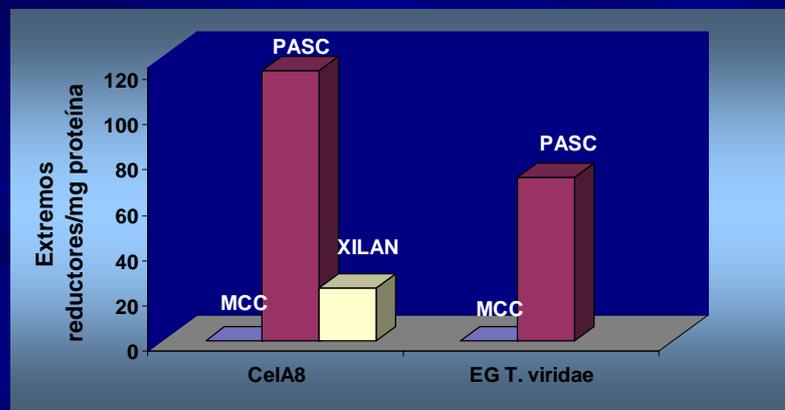
# Actividad de celA8 sobre diferentes sustratos



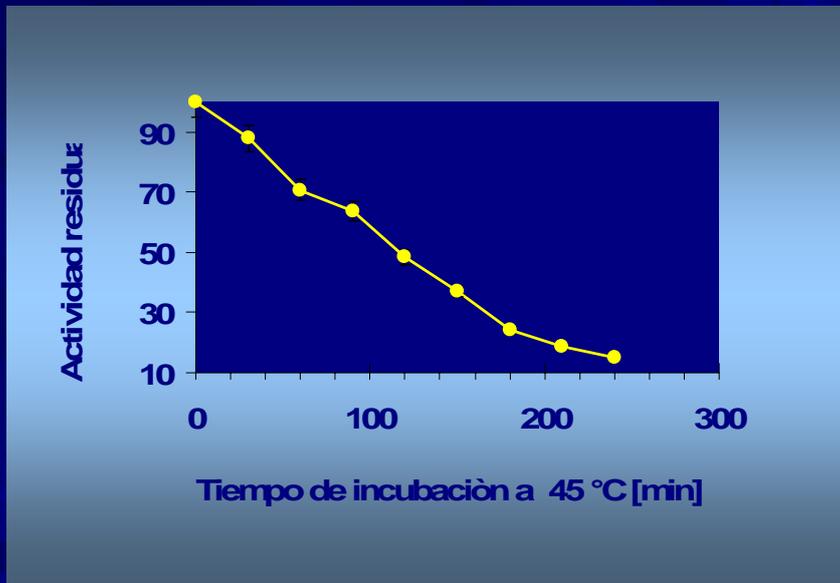
Substrate	Activity mU/mg
CMC	124.1
Lichenan	45.3
Beechwood xylan	15.8
Avicel	Not detected
pNPC	0.79
pNPGP	Not detected

MCC= Avicel= celulosa microcristalina

PASC= MCC pretratada con  $H_3PO_4$

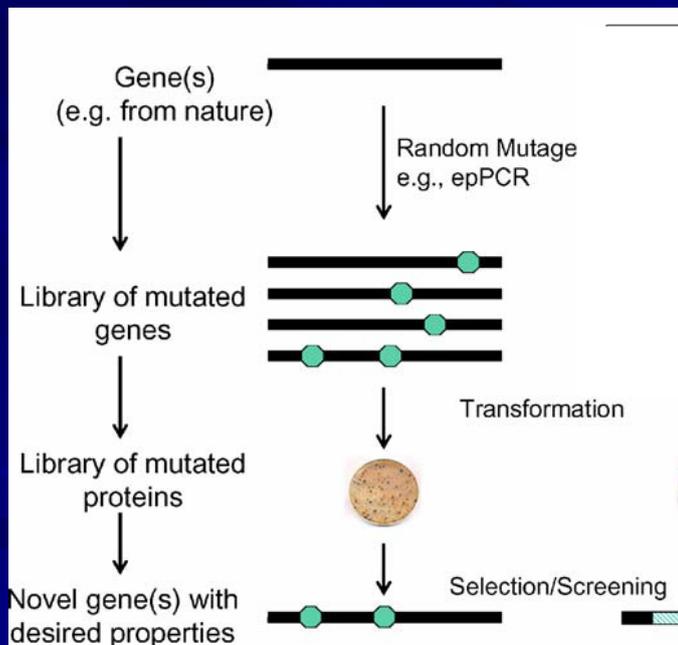


# ¿(In)estabilidad térmica de celA8?



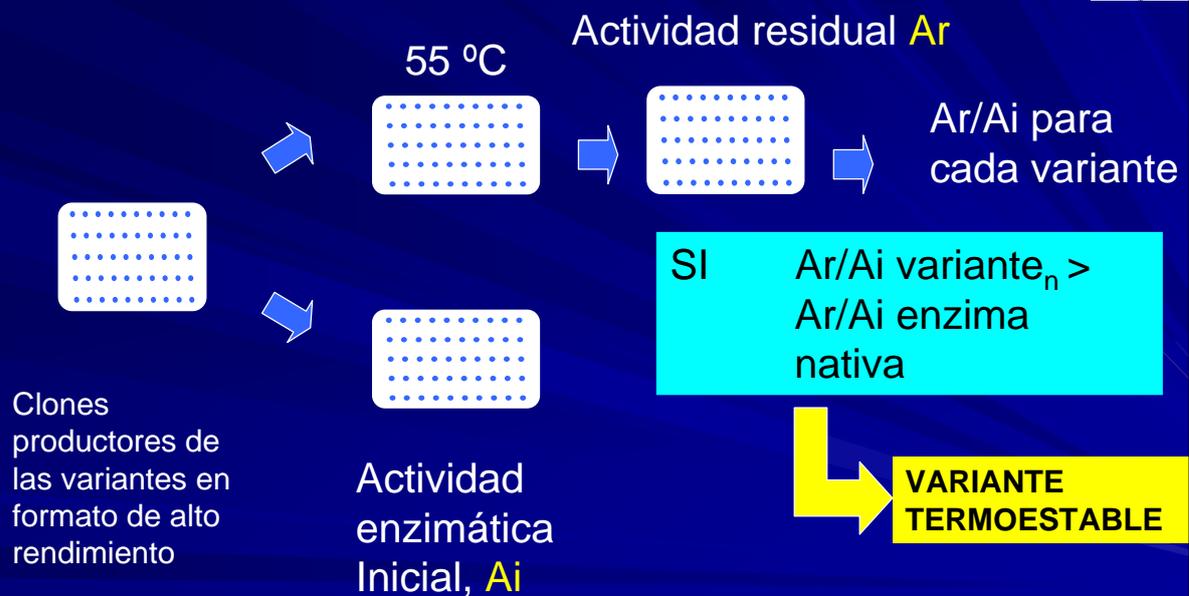
T1/2 ~120 min

# Mutagénesis de celA8 por PCR propenso a error

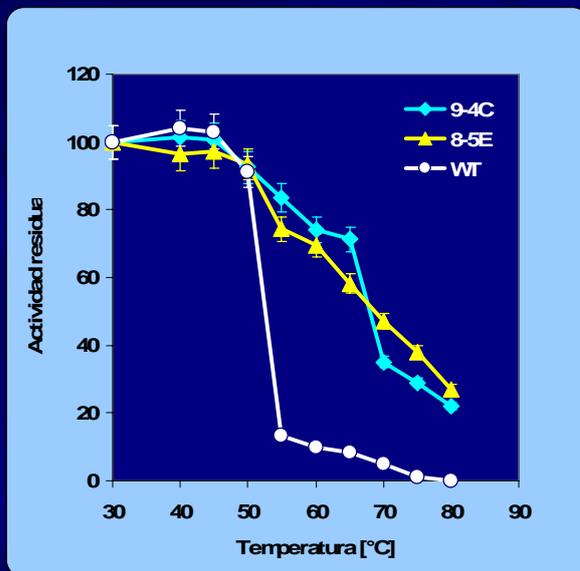


Después de varios ciclos, acumulación de mutaciones beneficiosas

# Test de termoestabilidad



# Estabilización térmica de celA8



T<sub>m</sub> celA8 silvestre  
~ 53 °C

T<sub>m</sub> variantes 9C4  
y 8-6E ~ 68 °C

Trabajo pendiente:

- Identificar cambios en la proteína responsables de la mayor termoestabilidad
- Estudiar la actividad de estas variantes con sustratos “reales” (madera, residuos, etc)

## In summary:



- We report the characterization and gene cloning of celA8, a **novel** modular endoglucanase produced by a cold tolerant *Pseudoalteromonas* strain.
- The recombinant, purified endoglucanase showed specific hydrolytic **activity at 25 °C approximately 30 times the specific activity of the commercial *Trichoderma viride* endoglucanase.**
- The enzyme is active between 15 and 50 °C. In combination with an appropriate cellobiohydrolase activity, CelA8 could be potentially useful for cellulose saccharification at **lower temperatures** than those applied in processes using use *Trichoderma* enzymes.
- Using a protein engineering approach we have been able to generate two celA8 variants with a **significant improvement of the thermal stability of the enzyme.**

# Agradecimientos



- Instituto Milenio de Dinámica celular y Biotecnología (ICDB).
- Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología, Universidad de Chile.