

PROYECTO INTERDISCIPLINARIO II

IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE ALTA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PARA EL TRATAMIENTO DE MADERA

Taller de biología sintética

INTEGRANTES:

- Espinoza Evaristo, Kevin Andres
- Otárola Ruiz, César Luciano
- Tarazona Flores, Leonardo Gabriel
- Vásquez Cerna, Leonardo André



Índice

- Introducción
- Problemática
- Conceptos clave
- Objetivos
- Procedimiento
- Impacto
- Presupuesto
- Conclusiones

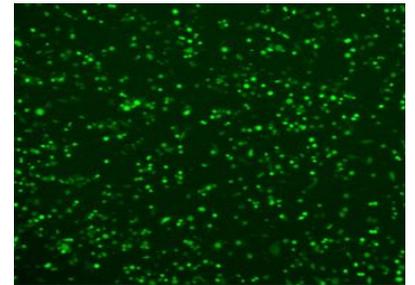
Introducción

¿Qué es la biología sintética?

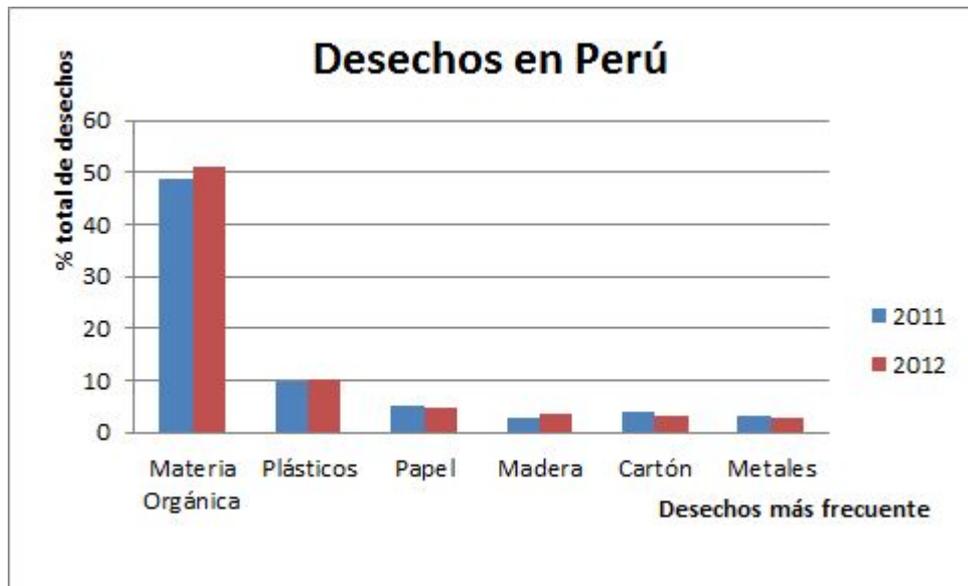
“La aplicación de la ciencia, la tecnología y la ingeniería para facilitar y acelerar el diseño, la fabricación y/o la modificación de material genético en organismos vivos” - Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria - EFSA (2020).



Se busca la Operatividad



Problemática



Fuente: MINAM (2012).

Problemática

Quema de madera	Reciclaje de residuos	Planta industrial de biocompost
<p>La quema de madera para obtener energía puede conducir a un aumento del 6% en las emisiones de carbono.</p>	<p>Las plantas de transformación se concentran mayoritariamente en la ciudad de Pucallpa; y en el 2012 obtuvieron un volumen de 126 619,85 m³ de madera, concluyendo que los residuos forestales de aserrado en las plantas de transformación primaria fueron de 20 %, y que estuvieron conformados por 7 % de viruta, y por 13 % de aserrín</p>	<p>El compostaje le permite reducir hasta un 50% el peso de los residuos que vayan a ser dispuestos en los rellenos sanitarios o botaderos.</p>

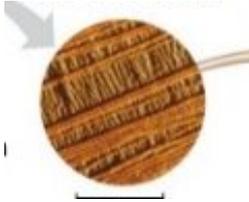
Fuentes:

Roca, J. (2018)

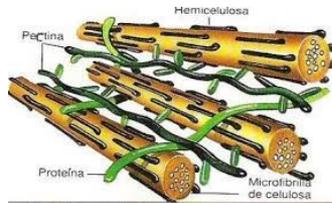
Vinces, R. y Poggi, J. (2014).

Conceptos clave

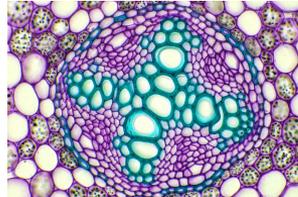
1. Componentes principales de la madera



Celulosa
(alrededor del
40-55%)



Hemicelulosa
(25-40%)

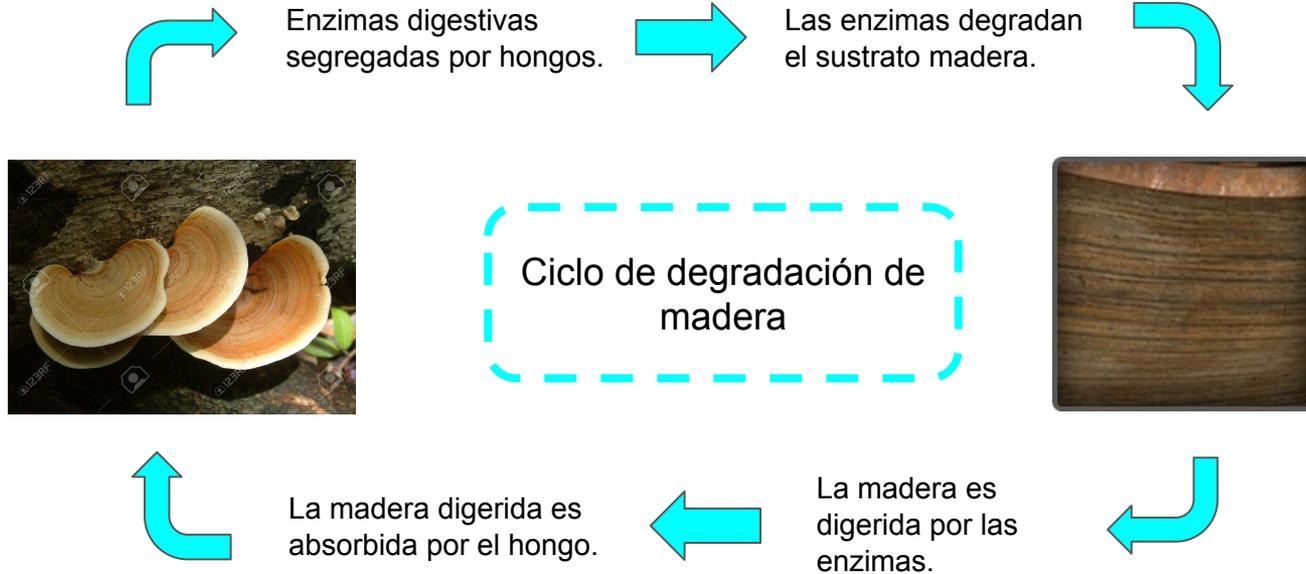


Lignina
(15-35%)

Mediante procesos naturales hechos por agentes externos, estos componentes son degradados por:

1. Celulasas
2. Hemicelulasas
3. Ligninasas

Conceptos clave



Hongos degradadores de madera

De acuerdo a cómo degradan las células de madera:

Fuente: Srivastava, S., Kumar y R, Singh, V. (2013)

Hongos de pudrición
blanda

Chaetomium

Aspergillus P.

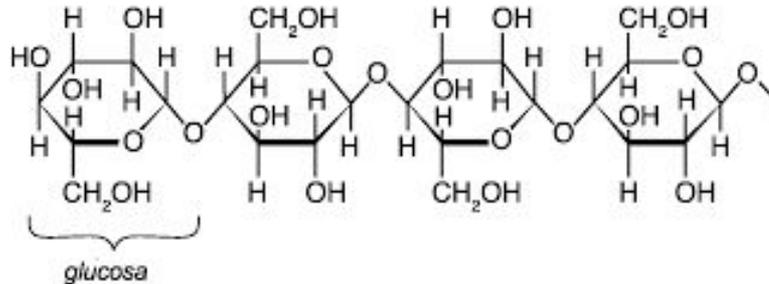


Rica en
celulasas.
No hay
efecto en
lignina.

Endoglucanasa

Rompe los enlaces
interiores de la celulosa.
Genera cadenas menos
polimerizadas.

Estructura de la Celulosa



Beta - glucosidasa

Rompe la celobiosa en
moléculas de glucosa.

Hongos de pudrición castaña

Fomes fomentarius

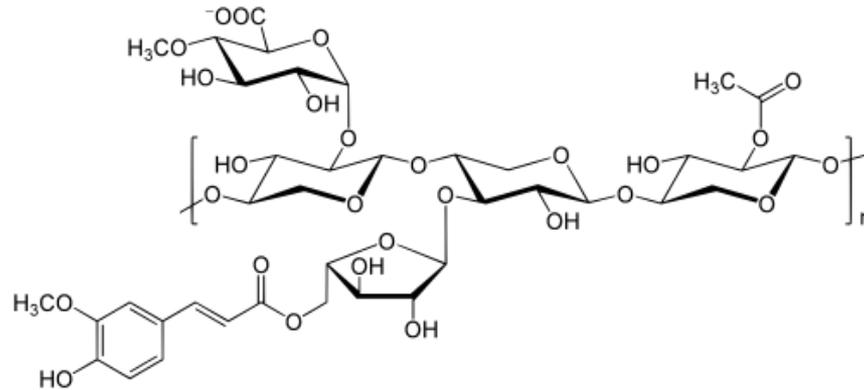
Serpula lacrymans



Contiene celulasas y hemicelulasas

Xilanasa

Rompe los enlaces xilano, principal componente de la hemicelulosa.



Estructura de la hemicelulosa

Arabinofuranosidasa

Separa las cadenas arabinosa de la cadena principal.

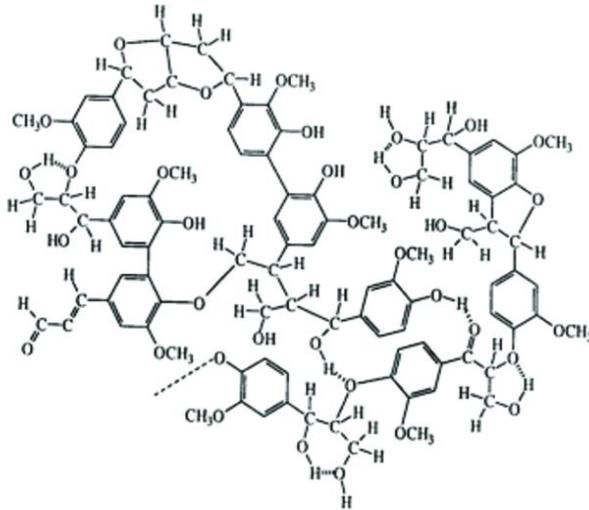
Hongos de pudrición
blanca

Xylaria (hypoxylon)

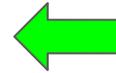
Serpula lacrymans



Contiene
ligninas y
celulasas



Estructura de la lignina



Lacasa

Oxida compuestos fenólicos
reduciendo el oxígeno
molecular a agua.

Objetivos

General

Implementar un sistema de producción enzimático para reducir el tiempo de degradación de materia orgánica vegetal.

Específicos

- Proponer una alternativa ecoamigable de degradación y gestión de residuos.
- Aprovechar la cantidad de residuos madereros producidos al año.



Les presentamos:



Enzimas degradadoras de materia orgánica

Procedimiento

1

Selección de componentes de **iGEM**



Promotores	gapA (2) y T7 (1)
RBS	RBS.1 (5)
Genes	Endo5a, bglX, XynB, ArfB, ecol Laccase
Terminadores	T1, TE y T7.

¿Por qué estos promotores?

T7

Nivel de producción de lacasa tras 2 horas: 7 umol/mg/min

Fuente: Zang, J., et.al. (2010)

gapA

Nivel de producción de endoglucanasa tras 16 horas: 0.13 umol/ml/min

Nivel de producción de betaglucosidasa tras 16 horas: 0.5 umol/ml/min

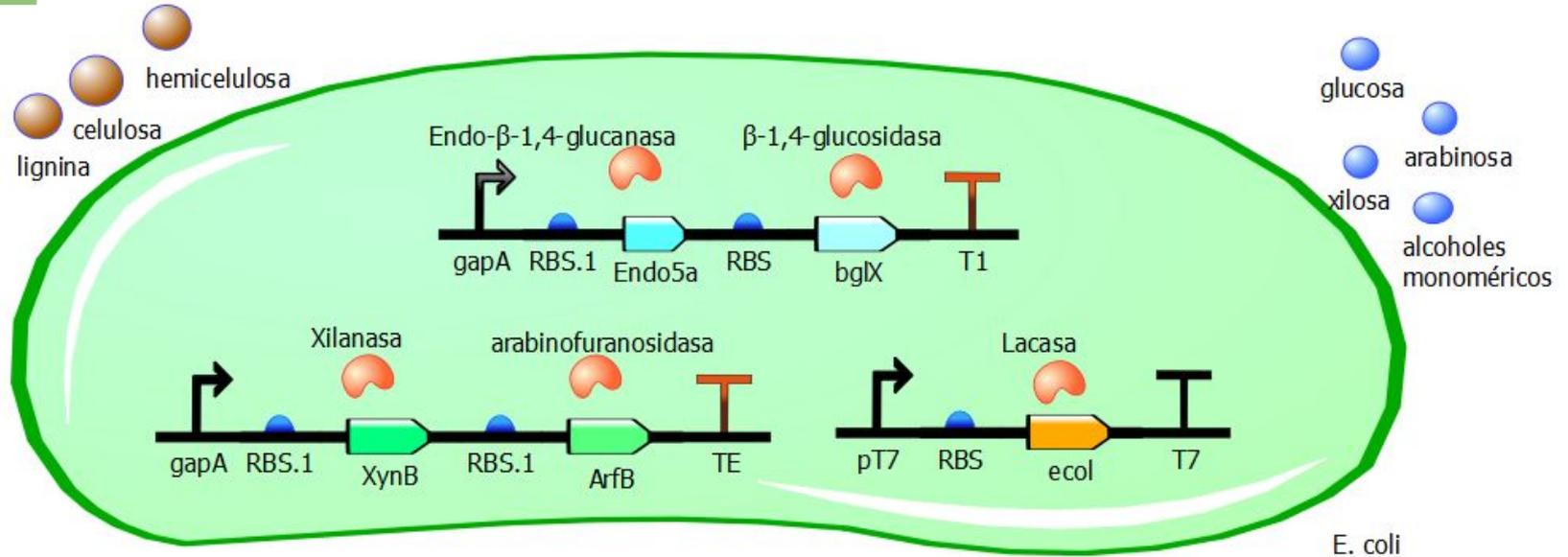
Fuente: Munjal, N., et.al. (2015)



Procedimiento

2

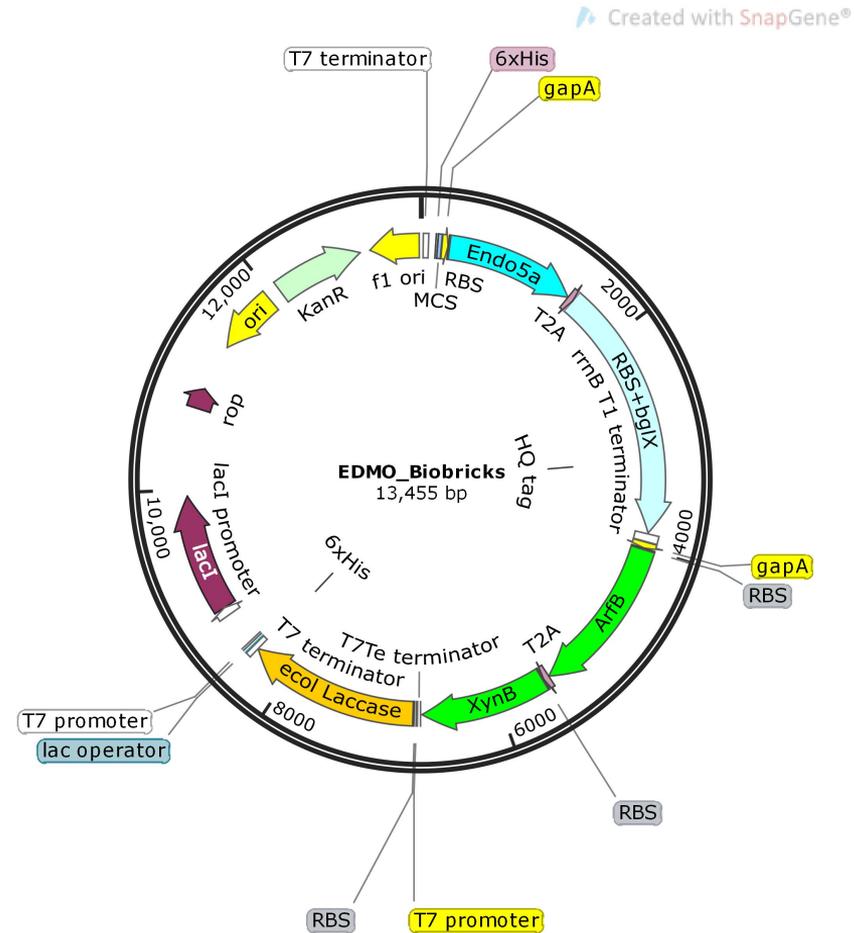
Construcción del esquema en Tinkercell



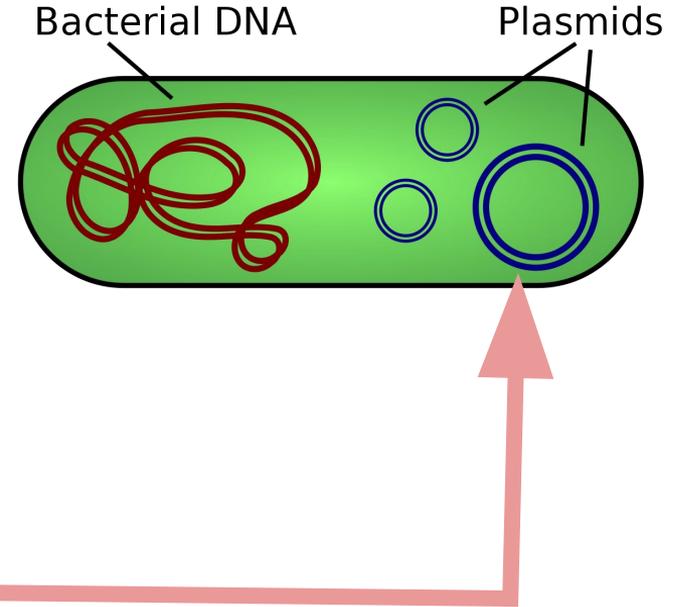
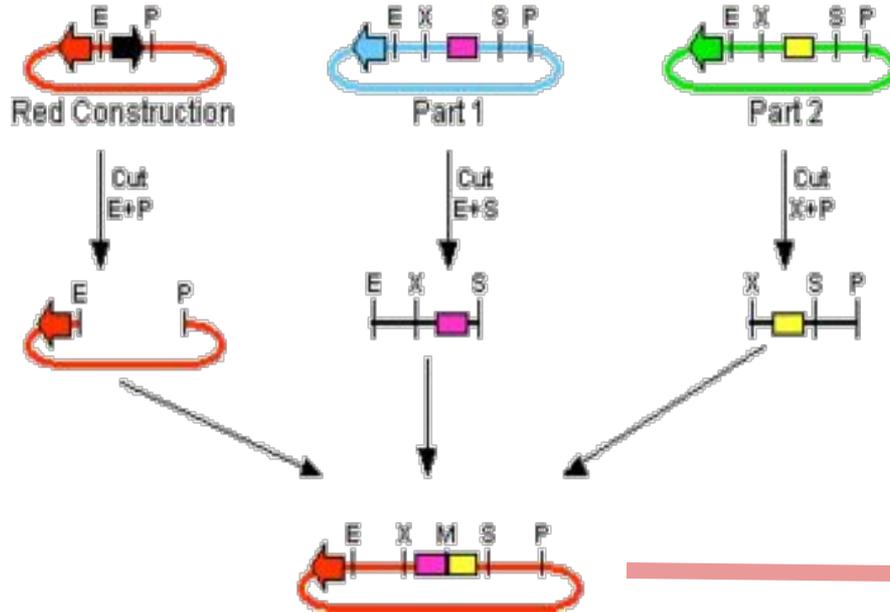
Procedimiento

3

Construcción del plásmido en **SnapGene®** mediante la técnica de Biobricks.



Procedimiento



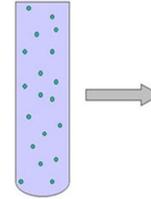
Procedimiento



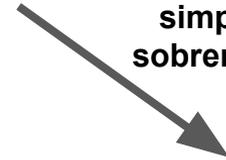
Acumulación extracelular de las enzima



Centrifugación



Sobrenadante



Decantación simple del sobrenadante



Aplicación de las enzimas a residuos orgánicos vegetales

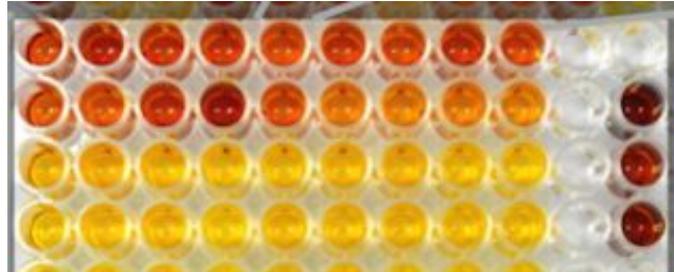


¿Cómo se demuestra su actividad enzimática?

Actividad enzimática probada y optimizada para expresión en *E. coli* (xynB y arfB)

xynB

arfB



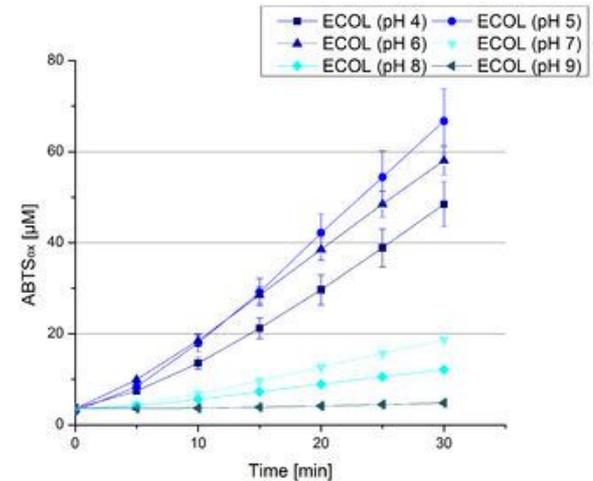
Fuente: Jiang, L. (2014).

Tienen experiencia de secreción extracelular en *E. coli*

Actividad enzimática tras 16 horas de incubación (gapA/extracelular)	Tras 1 hora	Tras 2 horas
Endoglucanasa	0.5 g/ml	1.15 g/ml
β -glucosidasa	2.54 g/ml	5.10 g/ml

Fuente: Munjal, N., et.al. (2015).

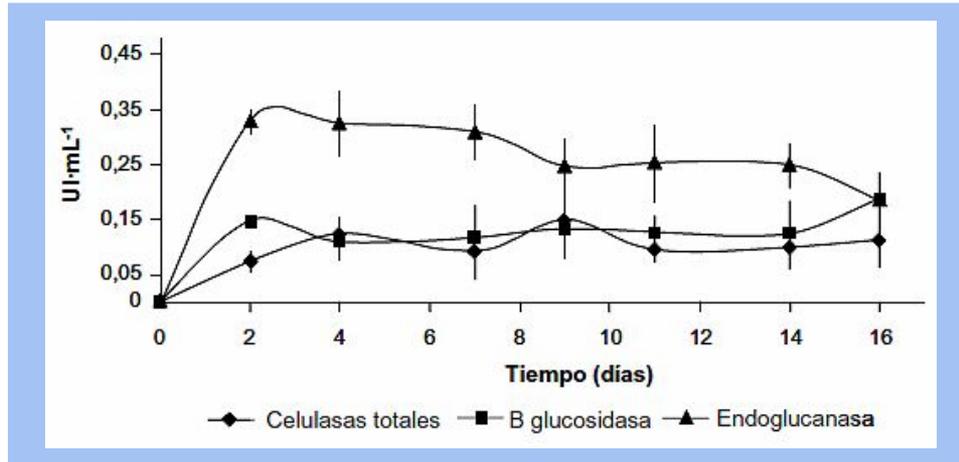
Actividad con tendencia exponencial con respecto al tiempo y amplio rango de PH (ecol laccase)



Fuente: Huber, I. (2012).

Impacto:

Comparación con la actividad enzimática de otros hongos:



Fuente: Manjarrés, K., Piñeros, Y, y Rodríguez-Sandoval, E. (2011).

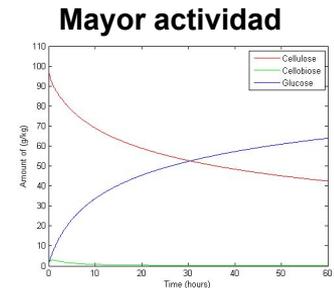
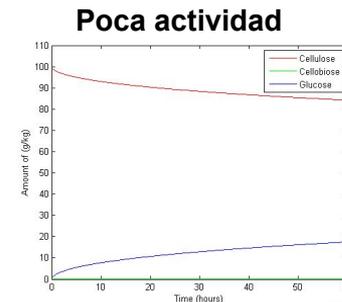
¿Qué significa una mayor actividad enzimática?

Con el hongo *Aspergillus* (Tras 48 horas):

- Glucosidasa: 0.15 umol/min/ml
- Endoglucanasa: 0.07 umol/min/ml

Con las enzimas secretadas por *E. coli* (Tras 16 horas) Según Munjal, N., et.al. (2015):

- Glucosidasa: 0.50 umol/min/ml
- Endoglucanasa: 0.13 umol/min/ml



Fuente: iGEM_Edinburgh (2011)

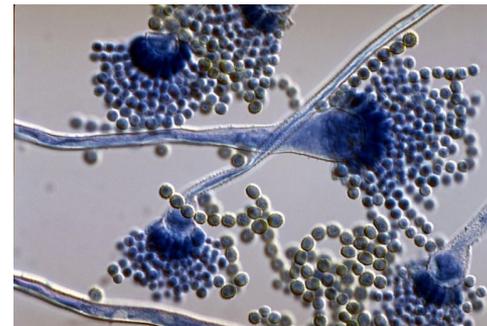
Impacto



Degradación más rápida y selectiva, a diferencia de la degradación natural en la que participan hongos u otros microorganismo del ambiente.

VENTAJAS DE NUESTRO PRODUCTO

Se separan directamente las bacterias de las enzimas, por lo que no se debe gastar recursos en asegurar la no toxicidad del producto, a diferencia de otros que trabajan con distintos microorganismo como hongos.



Aspergillus sp.

Presupuesto

Síntesis y ensamblaje del fragmento sintético	\$3726
Empaquetado	\$20
Costo total	\$3746

Datos obtenidos de <https://www.idtdna.com/>

Conclusiones

Nuestra propuesta de la biodegradación de madera y desechos orgánicos vegetales (EDMO) podría ayudar en la medida que:

- Representa una alternativa ecoamigable, dado que las enzimas secretadas por E.coli han pasado por un proceso de purificación previo en el que se aseguran los controles de calidad.
- Aprovecha la cantidad de residuos madereros y se complementa con el reciclaje de residuos orgánicos al reducir la madera en moléculas no dañinas (azúcares y alcoholes monoméricos).
- Es una alternativa de degradación más rápida frente a la degradación natural por hongos.

Referencias

- EFSA. (2020). *Nuevos avances en biotecnología*. Recuperado de <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/new-advances-biotechnology>
- Huber, I. (2012). *Part:BBa_K863005*. Recuperado de http://parts.igem.org/Part:BBa_K863005
- Ibañez, C. et. al. (2012). *Deterioro y preservación de madera*. Recuperado de <http://www.revista.unam.mx/vol.13/num5/art55/index.html>
- iGEM07_Imperial. (2007). *Part:BBa_I719005*. Recuperado de http://parts.igem.org/Part:BBa_I719005
- iGEM_Edinburgh (2011). *Cellulases (MATLAB model)*. Recuperado de [http://2011.igem.org/Team:Edinburgh/Cellulases_\(MATLAB_model\)](http://2011.igem.org/Team:Edinburgh/Cellulases_(MATLAB_model))
- Jiang, L. (2014). *Part:BBa_K1360002*. Recuperado de http://parts.igem.org/Part:BBa_K1360002
- Manjarrés, K., Piñeros, Y. y Rodríguez-Sandoval, E. (2011). Evaluación del complejo enzimático producido mediante el cocultivo de *Aspergillus sp.* y *Trichoderma sp.* en fase sólida sobre residuos de palma. *Bioagro*, 23(1), 19-26. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1316-33612011000100003&script=sci_arttext
- Martin, C. y Manzanares, P. (1994). *Biomasa lignocelulósica*. Recuperado de https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/38/094/38094291.pdf
- MINAM. (2012). *Informe Anual de Residuos Sólidos Municipales y No municipales en el Perú Gestión 2012*. Recuperado de <https://redrss.minam.gob.pe/material/20140423145035.pdf>

Referencias

- Munjal, N., Jawed, K., Wajid, S. y Yazdani, S. (2015) *A Constitutive Expression System for Cellulase Secretion in Escherichia coli and Its Use in Bioethanol Production*. Recuperado de <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0119917>
- Roca, J. (2018). Recuperado de <https://elperiodicodelaenergia.com/expertos-del-clima-cuestionan-la-biomasa-quemar-madera-para-obtener-energia-es-un-error/>
- Srivastava, S., Kumar, R. y Singh, V. (2013). *Wood Decaying Fungi*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/251232174_Wood_Decaying_Fungi
- Vines, R. & Poggi, J. (2014). APROVECHAMIENTO SOSTENIBLE DE LOS RESIDUOS FORESTALES PARA LA PRODUCCIÓN DE PELLETS DE BIOMASA LEÑOSA TORREFACTADA. Recuperado de <http://revistas.usil.edu.pe/index.php/syh/article/download/12/14>
- Zang, J. et. al. (2010). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the bacterial laccase CueO from E. coli. Recuperado de <https://www.semanticscholar.org/paper/Oxidation-of-polycyclic-aromatic-hydrocarbons-by-E.-Zeng-Lin/6915e8d228a0f0f84a0d375f5908b62cb939ea57>

**¡Muchas
gracias!**

