

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE CHILE
INACAP**

**SELECCIÓN FUNCIONAL DE GENES DE
TOLERANCIA DESDE UNA GENOTECA
PLURIGENÓMICA CONSTRUIDA A PARTIR DE
MICROORGANISMOS TOLERANTES A
INHIBIDORES DERIVADOS DE MATERIAL
LIGNOCELULÓSICO**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Alumno:
Mauricio A. Guajardo Parra

Profesor Guía:
PhD. Danilo Pérez P.

Profesora Co-guía:
PhD. Verónica M. Morgante

**Santiago - Chile
2019**

RESUMEN

El uso de biomasa vegetal se presenta como una alternativa viable y renovable en la búsqueda de energías que pudieran reemplazar el uso de combustibles fósiles, que a pesar de su menor costo, genera mayores emisiones de gases de efecto invernadero, provocando el cambio climático actual. La biomasa lignocelulósica derivada de las plantas está compuesta principalmente por celulosa y hemicelulosa (constituidas por largas cadenas de polisacáridos) y lignina (formada por polímeros de compuestos aromáticos). Para la explotación de la biomasa lignocelulósica en la producción de biocombustibles, uno de los mecanismos más utilizados es la hidrólisis ácida de la materia prima para obtener azúcares libres de ser asimilados por diversos microorganismos. Sin embargo, durante este tratamiento, se libera una gran cantidad de inhibidores del crecimiento bacteriano o LDIs (por sus siglas en inglés), los que limitan la producción de biocombustibles. La mayoría de estos LDIs son aldehídos de furano tales como furfural o 5-hidroximetilfurfural (HMF); o compuestos fenólicos como siringaldehído, vainillina y 4-hidroxibenzaldehído, entre otros. Este trabajo de investigación permitió construir genotecas plurigenómicas, utilizando el genoma de microorganismos aislados desde ambientes cuyas comunidades microbianas nativas están expuestas a un elevado estrés químico: i) lodos activados provenientes del tratamiento de efluentes de plantas de celulosa, ii) estanques de acumulación de residuos líquidos y sólidos generados durante la producción de aceite de oliva, y iii) suelos de jardín. Mediante métodos de cultivo de enriquecimiento se obtuvieron numerosas cepas bacterianas pertenecientes principalmente a los géneros *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Enterococcus* y altamente tolerantes a tres LDIs: furfural, ácido vanílico y siringaldehído (en concentraciones superiores a 45 mM, 60 mM y 25 mM, respectivamente). La construcción de la genoteca plurigenómica se llevó a cabo utilizando DNA genómico de 6 microorganismos, seleccionados de acuerdo a su tolerancia o proximidad taxonómica a la cepa hospedera *E. coli* DH10B. Esta moderna estrategia molecular facilitó la búsqueda de genes funcionales que contrarrestaron efectivamente la toxicidad a tres diferentes LDIs (furfural, siringaldehído y HMF). Es decir, se obtuvieron ocho clones con fragmentos de ADN heterólogo que otorgaron tolerancia a furfural, siringaldehído y HMF. En total se

identificaron 21 genes putativos de tolerancia, de los cuáles: dos codifican para proteínas de función desconocida, tres interactúan indirectamente con el DNA y dos codifican enzimas previamente asociadas a LDIs. Los 14 genes restantes codifican para proteínas cuyas funciones están bien descritas y/o caracterizadas, pero nunca antes fueron asociadas a tolerancia a LDIs. De esta forma, los fragmentos de DNA clonados son una fuente pródiga de genes de tolerancia. Sin embargo es necesario realizar un análisis más exhaustivo de estos fragmentos, a través de técnicas de ingeniería metabólica que faciliten dilucidar si el fenotipo mostrado se debe específicamente a uno de los genes clonados o si es un posible mecanismo que deriva de la expresión de la totalidad del DNA insertado. La realización de estos futuros análisis permitirá la proyección de un producto biotecnológico tangible para obtención de mayores rendimientos en la industria de biocombustibles.