



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Influencia del transporte de glucosa y la demanda de ATP,
sobre la velocidad de producción de etanol en *Saccharomyces
cerevisiae*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

SILVIA CAROLINA HERNÁNDEZ MOLINA



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Luz del Carmen Castellanos Román

VOCAL: Profesor: María del Carmen Wachter Rodarte

SECRETARIO: Profesor: Héctor Quezada Pablo

1er. SUPLENTE: Profesor: Francisco Ruíz Terán

2° SUPLENTE: Profesor: Jorge Arturo Aburto Anell

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

ASESOR DEL TEMA: HÉCTOR QUEZADA PABLO

SUSTENTANTE: SILVIA CAROLINA HERNÁNDEZ MOLINA

A Dios, el dueño de mi vida:

Bendeciré a Dios en todo tiempo;

Su alabanza estará de continuo en mi boca.

En Dios se gloriará mi alma;

Lo oirán los mansos, y se alegrarán.

Engrandeced a Dios conmigo,

Y exaltemos a una su nombre.

Sal. 34:1-3

Dios te alabo y te exalto por que sin duda eres un Dios de pactos y en ti todas las promesas son sí. Gracias Señor por que me has dado la vida, por que me has levantado, has secado mis lagrimas, has estado en mi vida en cada momento. Te doy gloria y quiero que sepas que este esfuerzo es para ti, por que Tú eres el que estuvo detrás de mi durante todo el proyecto de mi tesis, cuando me frustraba tu me levantabas y me alentabas, cuando me entristecía tu me consolabas.

Dios tu eres mi sabiduría y mi vida, me faltan las palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí, pero hoy quiero entregarte mi primer logro a ti. Te amo con todo mi corazón, mi alma y mis fuerzas.

A mis padres.

Por su infinito esfuerzo, las horas fuera de casa, días de trabajo sin descanso, por sacrificar y dejar de lado su vida por darme una educación y hacerme una mujer de bien, gracias!

Todos los días de agradezco a Dios por haberme puesto en su vida, pues para mi son un ejemplo a seguir y cuando crezca quiero ser como ustedes, los amo y les agradezco por su paciencia, cariño, apoyo y consejos que me han brindado a lo largo de mi vida. Porque la educación y los valores que hoy tengo

no los obtuve de la escuela sino de las maravillosas personas que tengo a mi lado y que llamo padres. Los admiro muchísimo y quiero dedicarles este pequeño logro a ustedes mis héroes.

A mi Hermano

Quiero decirte que te agradezco porque siempre has estado pendiente de mí y aunque no te gusta demostrarlo sé que me amas y yo también a ti. Te admiro y me has dado un ejemplo de esfuerzo y de perseverancia, contigo aprendí que puedes alcanzar cada uno de tus sueños por difíciles que parezcan si es que te lo propones.

A Adrián

Por llenar mi vida de felicidad y amor, por hacer que el mundo se detenga con solo un abrazo, por compartir conmigo tu vida, tus anhelos, tu corazón, por dejarme conocerte tal y como eres, por que cuando me sentía derrotada tu me levantabas, por enseñarme lo que es el verdadero amor, por ser no sólo mi novio sino también mi mejor amigo y el compañero de mi vida, gracias!

Quiero que sepas que tú eres parte de esto, que sin tu ayuda y apoyo no habría concretado esta meta. Gracias por tus consejos y tus desvelos, te amo muchísimo.

Las muchas aguas no podrán apagar el amor, ni lo ahogaran los ríos.

A mi familia

Por su infinito cariño, comprensión, consejos, regaños. Porque con su personalidad han pintado de color mi vida y puedo decir que gracias a ustedes soy una mejor persona. Los amo y agradezco a Dios por cada una de sus vidas.

A mi tutor

Dr. Quezada:

Muchísimas gracias por todo el conocimiento que compartió conmigo, por confiar en mi para la realización del proyecto, porque más que un tutor se convirtió en un amigo. Como alguna vez le dije: "para mi usted es el mejor tutor de todos y lo admiro mucho!".

A mis amigos.

A mis amigos (de la preparatoria, de las donas, las frijolerías, qa's, danza, mis hermanos en Cristo, del INC) que me impulsaron a seguir adelante, que cuando me quería dar por vencida no lo permitían, que me escucharon en momentos difíciles, que compartieron conmigo sus sueños, que a pesar de las circunstancias y la distancia estuvieron conmigo. A esas personas quiero agradecerle todo su tiempo, paciencia, tolerancia, amor, bueno todo lo que hicieron y hacen por mi los amo muchísimo.

A la maestra Luz

Gracias por fomentar en mí el gusto por la bioquímica, por compartir su conocimiento y más que nada por el apoyo que me brindó durante la realización de mi servicio y la revisión de mi tesis.

ÍNDICE

1. RESUMEN	9
2. ANTECEDENTES	10
2.1. Bioetanol	10
2.2. Glicólisis.....	12
2.3. Metabolismo del carbono en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
2.4. Transporte de hexosas dentro de la levadura.....	16
2.5. Control Metabólico del transportador de glucosa sobre la via glicolítica y la producción de etanol.....	17
2.6. Benzoato de sodio para incrementar la demanda de ATP.....	20
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	22
4.1. Objetivo general.....	22
4.2. Objetivos particulares.....	22
5. METODOLOGÍA	23
5.1. Diseño de oligonucleótidos.....	24
5.2. Extracción del DNA genómico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
5.3. Amplificación del gen mediante PCR.....	26

5.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	28
5.5. Purificación del gen <i>HXT1</i>	28
5.6. Ligación del gen <i>HXT1</i> al vector pJET.....	29
5.7. Transformación de bacterias.....	30
5.8. Extracción del plásmido. Mini prep.....	30
5.9. Digestión del plásmido pJET+ <i>HXT1</i>	32
5.10. Desfosforilación del plásmido pRS426.....	32
5.11. Ligación del gen <i>HXT1</i> a pRS426.....	33
5.12. Digestión para corroborar la identidad del gen.....	33
5.13. Secuenciación del gen.....	34
5.14. Transformación de levaduras.....	34
5.15. Extracción de RNA.....	36
5.16. Generación de cDNA.....	37
5.17. RT-PCR semicuantitativo.....	38
5.18. Extracción de proteína para hibridación tipo western.....	41
5.19. Western blot.....	42
5.20. Fermentaciones.....	43
5.21. Transporte de glucosa.....	43
5.22. Concentración de glucosa en el medio.....	44

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
6.1. Construcción del plásmido pCHXT1	46
6.2. Verificación de la identidad	51
6.3. Transformación de levaduras	57
6.4. Sobre-expresión del gen <i>HXT1</i>	57
6.5. Fermentaciones	61
6.6. Transporte de glucosa	67
6.7. Rendimiento	74
7. CONCLUSIONES	76
8. BIBLIOGRAFÍA	77
9. ANEXO I	80

1. RESUMEN

Debido a su importancia comercial e industrial, diversos estudios se han enfocado en entender la regulación de la vía glicolítica en *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo hasta la fecha no se han entendido a fondo los mecanismos que regulan el flujo glicolítico y la producción de etanol. Actualmente se sabe que el incremento en la transcripción de los genes que codifican para las enzimas de la glicólisis no provoca un aumento en la velocidad de producción de etanol.

Se ha propuesto al transporte de glucosa como uno de los componentes más importantes que determinan la velocidad de producción de etanol. Se ha determinado el grado de control metabólico ejercido por el transportador de hexosas en *Saccharomyces Bayanus* en fase diauxica, en donde obtuvieron como resultado un coeficiente de control de 1.04, lo cual indica que el control metabólico en estas condiciones recae completamente en el transporte de glucosa a través de la membrana plasmática.

Se conoce también que la sobre-expresión del transportador *HXT1* en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* en un medio con 5% de glucosa, da como resultado un aumento del 15% en la velocidad de producción de etanol.

Por otra parte se ha observado que el aumento en la demanda de ATP, genera que el flujo glicolítico se vea aumentado hasta dos veces.

Actualmente se reconoce que es necesario utilizar diversas estrategias genéticas para la generación de cepas con mayor velocidad de producción de

etanol. Es por esto que en nuestro grupo de trabajo se propuso combinar un aumento en la capacidad de transporte de glucosa con un incremento en la demanda de ATP, para estudiar el efecto de estas dos modificaciones sobre el flujo glicolítico. Esto se logró modificando a una cepa de la levadura con un plásmido que sobre-expresará al transportador *HXT1* (pCHxt1) y haciéndola crecer en un medio con 2 mM de benzoato de sodio. Los resultados obtenidos indican que no hay diferencia en la producción de etanol entre la cepa recombinante (pCHxt1) y la cepa silvestre (BY4741). Sin embargo cuando estas cepas crecen en un medio con 2mM de benzoato de sodio hay un aumento en la velocidad de producción de etanol y en el rendimiento de la vía. Por otro lado se midió y comparó la velocidad de transporte de glucosa de la cepa silvestre y recombinante; se observa que hay un aumento significativo en la velocidad de transporte en la cepa recombinante.

Estos resultados indican, que el transporte de glucosa en estas condiciones está excedido, por lo cual se concluye que éste no es una etapa limitante en la vía.

Es necesario que a partir de estos experimentos se busquen nuevas herramientas para continuar el estudio de la vía glicolítica, con las cuales se puedan generar cepas con una mayor velocidad de producción de etanol.

2. ANTECEDENTES

2.1. BIOETANOL

Debido a la disminución de las reservas de combustibles fósiles y energías no renovables y al impacto negativo de estos sobre el medio ambiente, es necesario, la búsqueda de fuentes alternativas de energía. La fuente más

común de energía renovable es el etanol generado a partir de la fermentación de azúcares de fuentes vegetales. **(Hahn-Hägerdal, 2006)**

El bioetanol o alcohol etílico es un biocombustible líquido producto de la fermentación de azúcares provenientes de fuentes vegetales (biomasa), que es llevada a cabo por la acción de microorganismos principalmente levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*. Es el biocombustible más producido en el mundo, en la actualidad su producción representa el 94% de la producción total de biocombustibles del mundo **(Balat et al, 2008)**. Actualmente Brasil y Estados Unidos ocupan los primeros lugares en producción de éste.

La producción de etanol en México es marginal, sin embargo la introducción de éste como combustible generaría grandes beneficios: generación de empleos, desarrollo de la economía rural, mejora de la seguridad energética, conservación de los recursos petrolíferos, desarrollo científico y tecnológico, entre otros. No se espera que el bioetanol reemplace completamente a la gasolina del mercado, sino se desea que éste pueda alargar los recursos petrolíferos y sea ahorro gasolina para el futuro. **(http://www.sener.gob.mx/webSener/res/PE_y_DT/pub/Biocombustibles_en_Mexico_Estudio_Completo.pdf)**.

Algunos de los mayores retos son hidrolizar eficientemente los residuos linocelulósicos, eliminar inhibidores producidos en la hidrólisis como acetatos y furfurales así como optimizar los procesos fermentativos, y una de las estrategias es mejorar la capacidad fermentativa de los microorganismos involucrados en esto. Debido a esto, en este proyecto se buscó obtener una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, modificada genéticamente, que tuviera una velocidad de producción de etanol mayor que la cepa silvestre.

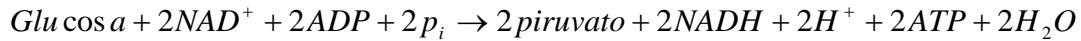
2.2. GLICÓLISIS

La glicólisis es una ruta central del catabolismo de la glucosa, en esta se degrada la glucosa en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente, generando piruvato y ATP. En *Saccharomyces cerevisiae*, el piruvato es convertido principalmente a etanol.

La glicólisis consta de dos fases: La fase preparatoria y la fase de beneficios. En la fase preparatoria, se invierte ATP para convertir la glucosa en el intermediario fosforilado fructosa 1,6-bisfosfato y a continuación se rompe el enlace carbono-carbono entre C-3 y C-4 dando dos moléculas de triosas fosfato.

En la fase de beneficios cada una de las moléculas de gliceraldehído 3-fosfato derivadas de la glucosa se oxidan en el C-1; la energía de esta reacción de oxidación se conserva en forma de NADH y un enlace acil fosfato del 1-3 bifosfoglicerato. Este compuesto tiene un potencial de transferencia del grupo fosfato elevado y en una fosforilación a nivel sustrato catalizada por la fosfoglicerato cinasa se transfiere el grupo fosfato al ADP formando ATP y 3-fosfoglicerato. El reordenamiento de los átomos en el 3-fosfoglicerato con pérdida de agua da lugar al fosfoenolpiruvato, otro compuesto con potencial de transferencia del grupo fosfato elevado. El fosfoenolpiruvato da un grupo fosfato al ADP formando ATP en la segunda fosforilación a nivel sustrato; el otro producto de esta reacción es el piruvato, que es el producto final de la fase de beneficios de la glicólisis.

La ecuación global de la glicólisis es:



El piruvato constituye un punto importante de ramificación metabólica. En los organismos aeróbicos o tejidos, bajo condiciones aeróbicas la glicólisis es la primera etapa de la degradación completa de la glucosa. El piruvato se oxida a CO_2 con la pérdida del grupo carboxilo para transferir el grupo acetilo a la coenzima A para producir acetil-coenzima A, posteriormente el grupo acetil es oxidado completamente a CO_2 por el ciclo del ácido cítrico. Los electrones que se forman de estas oxidaciones son pasados al O_2 a través de una cadena de acarreadores en la mitocondria para formar H_2O . Esto lleva a la síntesis de ATP en la mitocondria.

La segunda ruta del piruvato es la reducción en un solo paso a lactato vía fermentación ácido láctica, llevada a cabo por algunas bacterias y tejidos hipóxicos. La tercera ruta principal del catabolismo del piruvato conduce a la síntesis de etanol. (Lehninger, 2005)

2.3. METABOLISMO DEL CARBONO EN *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae ha sido descrita como un microorganismo anaerobio facultativo, lo cual significa que es capaz de proliferar en tanto en condiciones aerobias como en condiciones anaerobias. Es capaz de utilizar un amplio rango de metabolitos: mono-, di- y oligosacáridos, etanol, acetato, glicerol, piruvato y lactato. La glucosa es el metabolito favorito de está para el abastecimiento del carbono y su modo preferido de metabolismo es la fermentación por medio de

vía Embden- Meyerhof, la cual genera como metabolito final etanol Fig. 2.1.

(Dickinson, 1999)

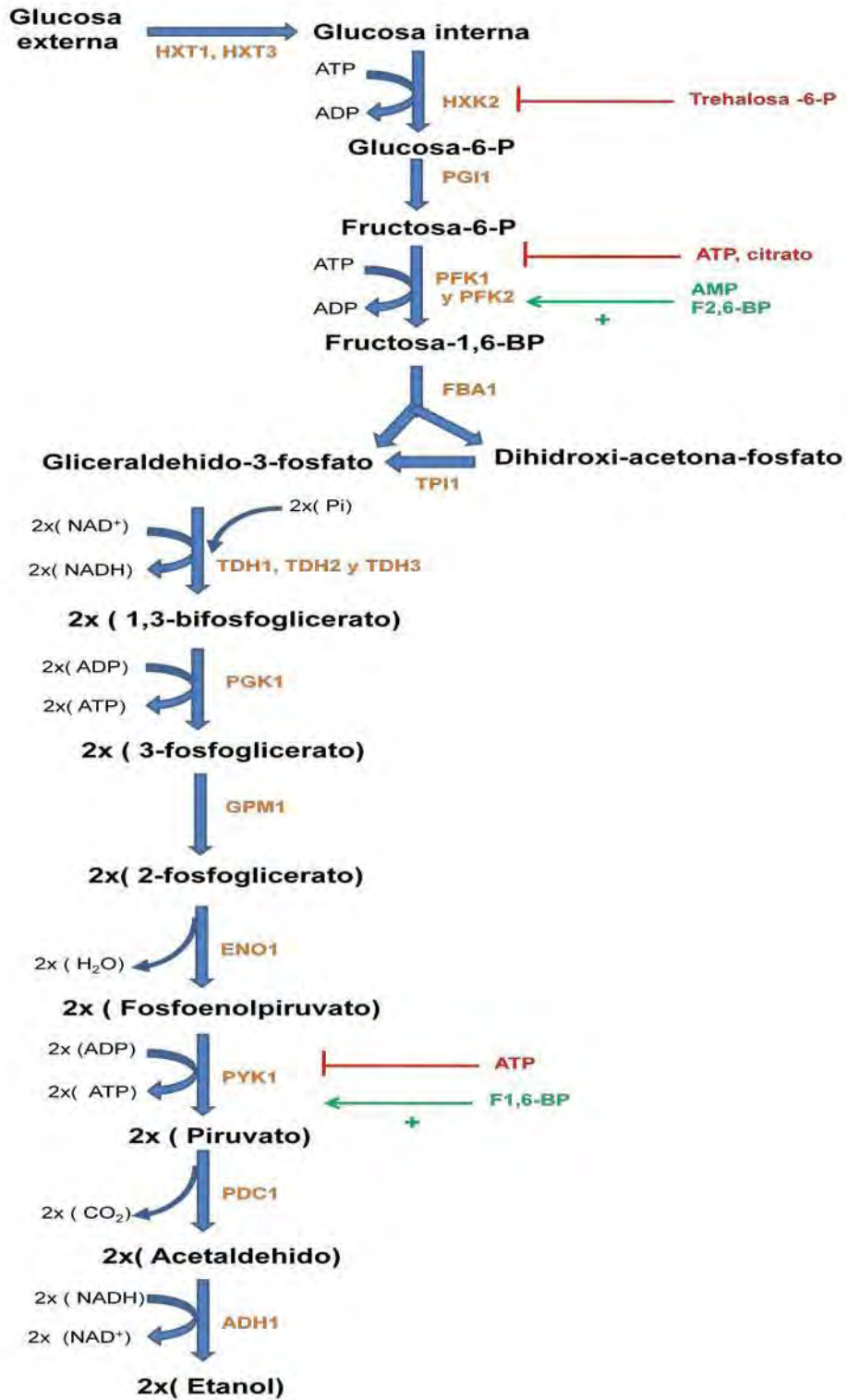




Fig. 2.1 Metabolismo del carbono en *Saccharomyces cerevisiae*, vía Embden-Meyerhof. HXK: Hexocinasa ; PGI: Fosfoglucosa isomerasa; PFK: Fosfofructo

cinasa; FBA: Fructosa 1,6-bifosfato aldolasa; TPI: Triosa fosfato isomerasa;
TDH: Gliceraldehido 3- fosfato deshidrogenasa; PGK: Fosfoglicerato cinasa;
GPM: Fosfoglicerato mutasa; ENO: Enolasa; PYK: Piruvato cinasa; PDC:
Piruvato descarboxilasa; ADH: Alcohol deshidrogenasa..  Inhibidores
 Activadores.

Dada la importancia de esta fermentación, desde hace décadas se han intentado desarrollar cepas con mayor capacidad fermentativa, es decir con mayor producción de etanol (**Shaaff, 1989; Larsson, 2000**). Diversos grupos han estudiado la vía y actualmente se sabe, que la regulación transcripcional de los genes que codifican para las enzimas de la glicólisis juega un papel poco relevante en la modulación del flujo y en la concentración de intermediarios. (**Daran-Lapujade, 2007**)

Se considera que el principal mecanismo de control del flujo es la modulación de la actividad enzimática mediada por sustratos, productos o metabolitos efectores. Sin embargo no se han identificado las enzimas particulares que limitan el flujo de la vía *in vivo*. El entendimiento de la regulación de esta vía permitirá la construcción de cepas modificadas genéticamente con mayor velocidad de producción de etanol.

Se ha propuesto que hay tres enzimas cuya modulación es determinante para regular el flujo de la glicólisis: la hexocinasa (HXK), la fructosa 6-fosfato cinasa tipo 1 (PFK1) y la piruvato cinasa (PK). Sin embargo la sobreproducción individual y simultánea de estas enzimas glicolíticas, no incrementan el flujo glicolítico o el incremento es pequeño (**Schaaf, 1989**). Es por esto que el transporte de glucosa se ha propuesto como uno de los procesos más

importantes que determinan la velocidad de degradación de glucosa y por lo tanto la velocidad de producción de etanol. **(Elbing, 2004)**

2.4. TRANSPORTE DE HEXOSAS DENTRO DE LA LEVADURA.

En *Sacharomyces cerevisiae* las hexosas son transportadas por difusión facilitada mediante transportadores de hexosas (HXT). Estos difieren considerablemente en la especificidad hacia el sustrato y en la afinidad. La presencia de múltiples transportadores de glucosa no es sorpresa, debido a que esta levadura puede crecer en un amplio rango de concentraciones de glucosa. **(Elbing, 2004; Özcan, 1999)**

Sin embargo de los 20 genes pertenecientes a la familia *HXT*, solo siete codifican para proteínas funcionales de transportadores de glucosa. Una cepa donde fueron eliminados estos siete genes (de *HXT1* a *HXT7*), fue incapaz de crecer en glucosa, fructosa o manosa y no presentaba flujo glicolítico **(Boles, 1997; Reifenberger, 1997)**. La introducción de cualquiera de estos genes en esta mutante es suficiente para permitirle crecer en glucosa. *HXT2*, *HXT6* o *HXT7* eran suficientes para permitirle a la levadura crecer en concentraciones de glucosa de 0.1%, lo cual sugiere que estos codifican para transportadores de alta afinidad; mientras que la introducción de los genes *HXT1*, *HXT3* o *HXT4* permitían a esta crecer solo en concentraciones altas de glucosa (mayor a 1%) **(Reifenberger, 1997)**, es decir que estos genes codifican para transportadores de baja afinidad.

Debido a esto se conoce que la levadura cuenta con dos sistemas de transporte de hexosas (de alta y baja afinidad) y que los transportadores Hxt1p, Hxt2p, Hxt3p, Hxt4p, Hxt6p y Hxt7p son los más importantes en la captación de

glucosa. Hxt1p y Hxt3p son transportadores de baja afinidad (K_m para glucosa, ~50 a 100mM), Hxt4p es un transportador de baja afinidad moderada, y Hxt2p, Hxt6p y Hxt7p son transportadores de alta afinidad (K_m para glucosa ~1 a 4Mm). (Özcan, 1999; Rossi, 2010)

Concentraciones altas de glucosa median la represión de genes que codifican para transportadores con afinidades altas e intermedias, y al mismo tiempo se induce a la expresión de los genes que codifican para los transportadores de baja afinidad. Específicamente HXT1 y HXT3, los cuales son transportadores predominantes en los medios con concentraciones de glucosa 4% o 222 mM. En estas condiciones y en ausencia de oxígeno la velocidad de fermentación alcohólica es muy alta.

2.5. CONTROL METABÓLICO DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA SOBRE LA VÍA GLICÓLITICA Y LA PRODUCCIÓN DE ETANOL.

El transporte de glucosa, la hexocinasa, fosfofructocinasa y la piruvato cinasa se han propuesto como los principales puntos de control sobre el flujo glicolítico en *Saccharomyces cerevisiae*.

Schaaf et al. Realizaron un estudio en el cual se sobre-expresaron ocho enzimas glicolíticas de manera individual y simultánea, las cuales incrementaron su actividad de 3 a 13 veces. Sin embargo como se muestra en la figura 2.2 no hay una diferencia significativa en la producción de etanol y por lo tanto en el flujo glicolítico entre la cepa silvestre y las cepas recombinantes. También se realizó un estudio en donde se sobre-expresaron siete enzimas simultáneamente de la parte baja de la vía glicolítica, a partir de la G3PHD, y al igual que en el estudio anterior no hubo incremento en la velocidad de

producción de etanol. (Hauf J., 2000) Con lo cual se concluye que la concentración de las enzimas en la cepa silvestre está excedida y por lo tanto dichas enzimas no son una etapa limitante en el flujo glicolítico.

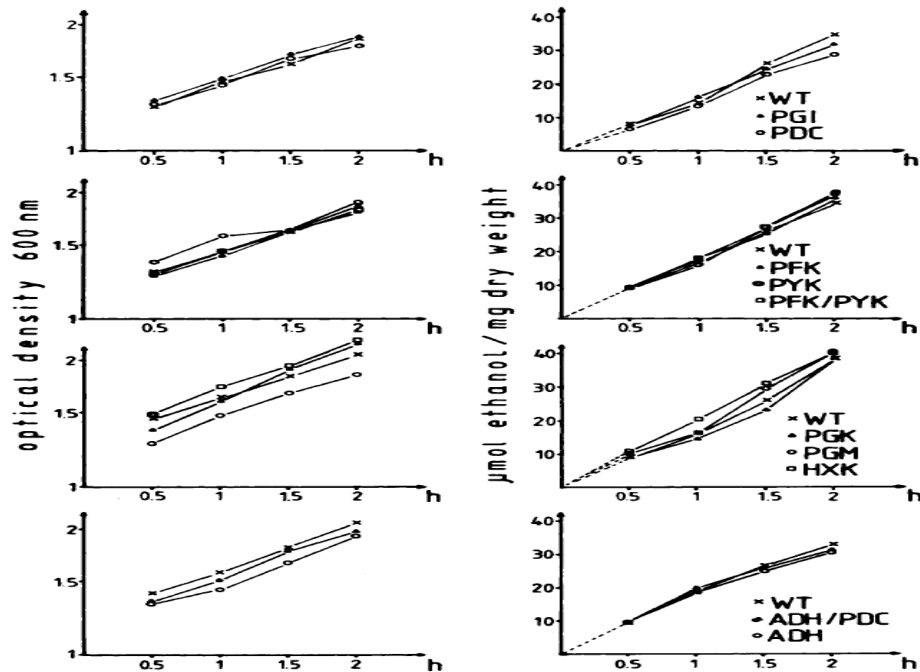


Figura 2.2 Curvas de crecimiento y producción de etanol. (Schaaf et al. 1989).
 WT: Cepa Silvestre; PGI: Fosfoglucoisomerasa; PFK: Fosfofructocinasa; PYK: Piruvato cinasa; PGK: Fosfoglicerato cinasa; GPM: Fosfoglicerato mutasa; HXK: Hexocinasa; PDC: Piruvato des carboxilasa; ADH: Alcohol deshidrogenasa.

Debido a estos resultados y a que se ha considerado al transporte de glucosa como uno de los pasos limitantes en la producción de etanol, se han realizado estudios de análisis de control metabólico del transportador de glucosa sobre la vía de la glicólisis.

Se realizó un estudio para determinar el grado de control metabólico ejercido por el transportador de hexosas en *Saccharomyces bayanus*, el estudio se

realizó en fase diauxica, es decir cuando hay una concentración muy baja de glucosa en el medio, y se calculó el coeficiente de control ejercido por éste.

Se realizó una gráfica de flujo contra velocidad máxima, donde el flujo se refiere a la velocidad de consumo de glucosa, de esta gráfica se obtuvo el coeficiente de control calculando la pendiente de la recta, de acuerdo al análisis de control metabólico el coeficiente de control puede estar en un rango de entre 0 y 1, dando como valor 1 al paso limitante en la vía. El coeficiente de control que se obtuvo de acuerdo a la gráfica 2.3 fue de 1.04, lo cual indica que todo control del flujo glicolítico está en el transporte de glucosa a través de la membrana plasmática. En otras palabras, el transporte de glucosa en estas condiciones es el paso limitante de la vía. (Diderich J., 1999)

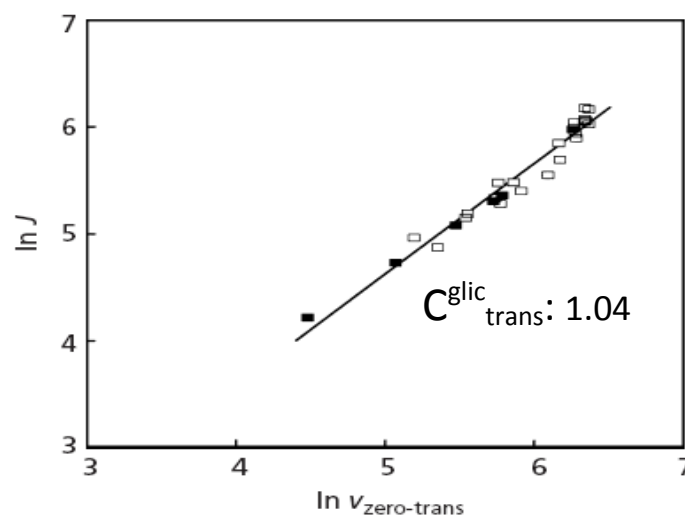


Figura 2.3 Gráfica de análisis de control metabólico. Doble logaritmo flujo vs velocidad máxima. $C_{\text{trans}}^{\text{glic}}$; Coeficiente de control de flujo.

También se realizó un estudio donde se sobre-expresaron los transportadores de glucosa *HXT1* y *HXT7* de manera individual, en este estudio se deseaba conocer si la sobre-expresión de estos transportadores tendría un efecto

significativo sobre la producción de etanol. Esta sobre-expresión fue realizada con una construcción integrada al cromosoma. De acuerdo a este estudio cuando se sobre-expresó el transportador *HXT1*, en un medio con 5% de glucosa hay un incremento significativo de 15% de etanol, sin embargo cuando dicha cepa crece en un medio con 2% de glucosa no hay diferencia significativa en la producción de etanol, entre la cepa silvestre y la cepa recombinante. **(Rossi, 2010)**

2.6 BENZOATO DE SODIO PARA INCREMENTAR LA DEMANDA DE ATP.

Se ha propuesto que los procesos de consumo de ATP juegan un papel importante en el control de flujo glicolítico.

En *Escherichia coli*, se ha demostrado experimentalmente que el mayor control de flujo glicolítico, mayor al 75%, reside en la demanda de ATP, de donde se calculó el coeficiente de control de flujo el cual tiene un valor de 0.96.

(Koebmann B., 2002)

En *Saccharomyces cerevisiae* se han realizado estudios para determinar el efecto que tiene el ácido benzoico en la demanda de ATP y en el flujo de la vía glicolítica.

Se ha observado que a bajas concentraciones de benzoato de sodio (más de 0.4mM) hay un incremento en la producción de etanol; sin embargo a altas concentraciones (mayores a 2.5 mM) la producción de etanol disminuye significativamente. **(Warth A., 1991.)**

En otro estudio se observó que añadiendo 2mM de benzoato de sodio hay un incremento en el flujo glicolítico de hasta dos veces en un medio anaerobio (figura 2.4). **(Daran-Lapujade P. et al, 2007)**

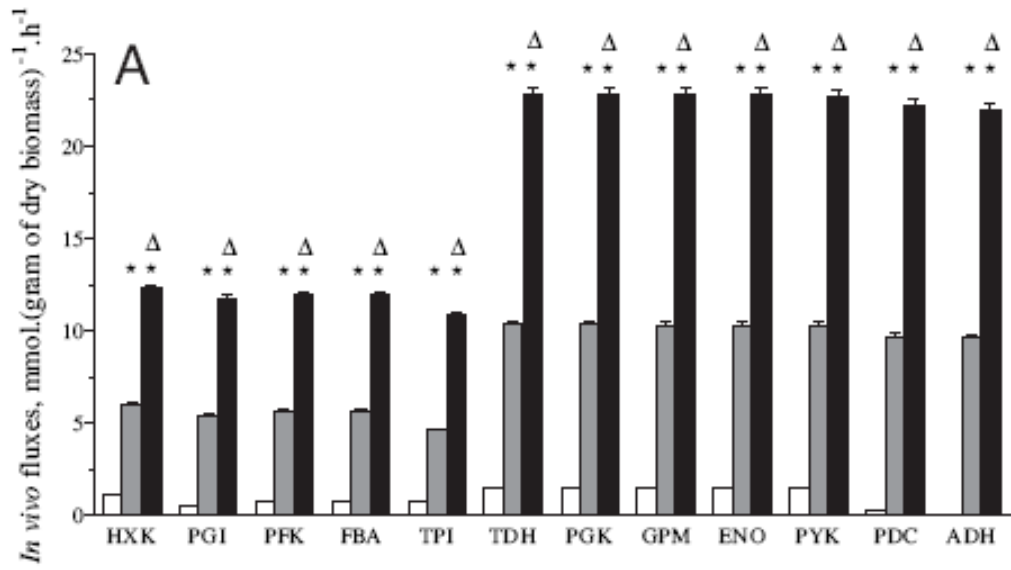


Fig. 2.4 Medición de flujos a través de las enzimas glicolíticas en medio aerobio (barras blancas), medio anaerobio (barras grises) y medio anaerobio con 2mM de benzoato de sodio (barras negras)

3. HIPÓTESIS

Si el transporte de glucosa es uno de los procesos más importantes que determinan la velocidad de producción de etanol en presencia de 2mM de benzoato de sodio, la sobre-expresión del transportador de glucosa *HXT1* en *Saccharomyces cerevisiae* aumentará la velocidad de producción de etanol.

4. OBJETIVOS

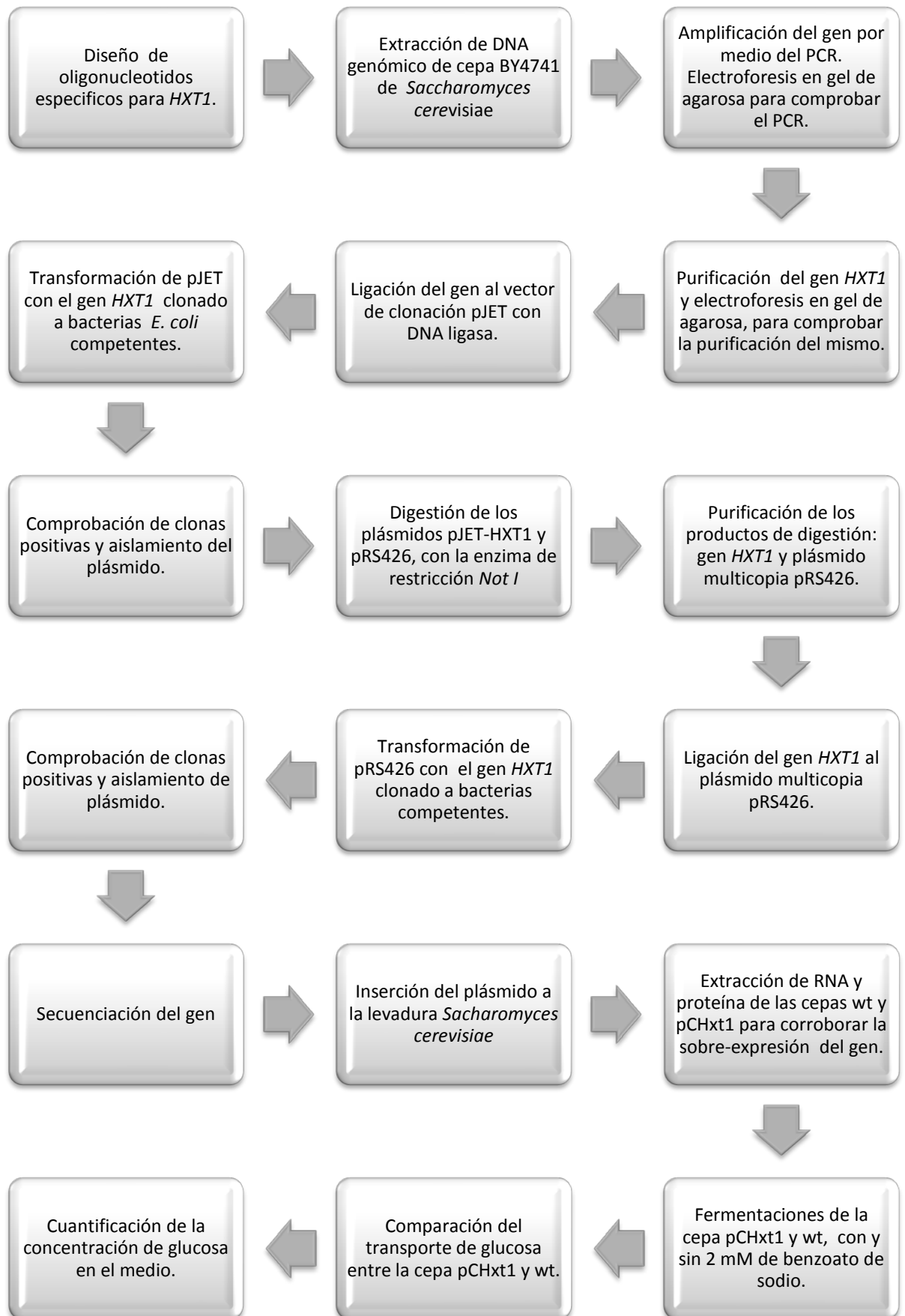
4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la sobreexpresión del transportador de glucosa Hxt1 y la demanda de ATP sobre la velocidad producción de etanol en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Construcción de una cepa recombinante en la cual se sobre-exprese el transportador de glucosa Hxt1
2. Comparar los niveles de transcripción del gen *HXT1*, entre la cepa silvestre y la cepa recombinante.
3. Comparar la producción de proteína Hxt1 entre la cepa silvestre y la recombinante.
4. Comparación de las capacidades fermentativas entre la cepa recombinante y la cepa silvestre en ausencia y presencia de 2mM de benzoato de sodio.
5. Medición del transporte de glucosa de la cepa recombinante.

5. METODOLOGÍA



Se realizó una construcción genética, donde se insertó el gen del transportador de glucosa de baja afinidad *HXT1* en un plásmido multicopia para la levadura pRS426, para lograr la sobre-expresión de éste. Posteriormente, se comprobó la sobre-expresión del gen, mediante la cuantificación semicuantitativa del mRNA y la proteína.

Una vez comprobada la sobre-expresión del gen se realizaron fermentaciones con y sin benzoato de sodio para conocer si la velocidad de producción de etanol aumenta, y por último se realizó el experimento de transporte para saber si la proteína sobre-expresada es funcional y si por lo tanto la cepa recombinante (pCHxt1) tendrá una mayor velocidad de transporte de glucosa.

5.1. Diseño de oligonucleótidos

Se obtuvo la secuencia del gen *HXT1* a través de una base de datos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org/>), y con dicha secuencia se diseñaron los oligonucleótidos para posteriormente realizar la PCR.

Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando una herramienta en línea (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html). Estos deben ser iniciadores cortos, complementarios a la secuencia del gen a amplificar y deben tener las siguientes características:

1. Terminar en G o C, con una longitud de cadena de 20 a 24 nucleótidos
2. Deben tener un porcentaje superior al 40% de guanina-citosina
3. Tm ajustada a Sal de 65 a 70°C. Este es un punto muy importante en la realización de los oligonucleótidos, y a que en el alineamiento de los

mismos con la cadena de DNA en la PCR, se requerirá una temperatura alta, aproximadamente de 60 a 65°C para favorecer la especificidad.

4. Sin puntas complementarias.

5.2. Extracción del DNA genómico de *Saccharomyces cerevisiae*

Se inocularon las levaduras en un matraz con 50 mL de medio YPD (1% de extracto de levadura, 2% peptona de caseína y 2% de dextrosa anhidra) toda la noche. Se cosecharon y se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió con 500µL de agua estéril. Se centrifugó nuevamente durante 10 segundos y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se agregaron 200µL de una solución de Tritón X-100 al 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM pH 8 y Na-EDTA 1 mM y 200µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se añadieron 0,3g de perlas de vidrio y se agitaron con ayuda del vortex 5 minutos para romper las levaduras. Se le agregaron 200µL de amortiguador TE. Se centrifugó nuevamente a 14000 rpm y se colectó la fase acuosa evitando tocar las otras dos fases. Se lavó dos veces más con la solución de fenol-cloroformo-isoamílico sin perlas de vidrio, para tener un total de 3 lavados. Posteriormente se agregó 1mL de etanol al 100% y se mezcló por inversión, nuevamente se centrifugó a 14000 rpm por 4 minutos, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 400µL de TE y 10 µL de RNAasa (10mg/mL) se incubó 30 minutos a 37°C y se agregó 10µL de acetato de amonio(4M) y 1mL de etanol (100%), se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000 rpm 2 minutos, se desechó el sobrenadante y se dejó secar el pellet por 30 minutos para evitar que quedaran restos de etanol en el pellet. Finalmente se resuspendió en 50µL de agua destilada estéril.

5.3. Amplificación del gen mediante PCR.

Una vez obtenido el DNA genómico de *Saccharomyces* y con los oligonucleótidos diseñados, se realizó la amplificación del gen que codifica para el transportador de glucosa *HXT1* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. Se utilizó como templado el DNA genómico de la levadura y los oligonucleótidos. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

H ₂ O	22.5 µL
Buffer pfu 10x	5 µL
MgSO ₄ 25mM	5 µL
DNA genómico	1 µL
Primer HXT1 _{NotI} Fo	5 µL
Primer HXT1 _{NotI} Re	5 µL
dNTP's	1 µL
Pfu	0,5 µL
Total	50 µL

La reacción se llevó a cabo en un termociclador, el cual fue programado de la siguiente manera:

PROGRAMA DE PCR PARA EL GEN *HXT1*

	Temperatura (°C)	tiempo (min)
1	95	2
2	95	1
3	60	1

4	72	2,5 (repetir pasos 2,3 y 4 por 34 ciclos adicionales)
5	72	10
6	4	Pausa

En cada uno de los ciclos del PCR ocurre lo siguiente:

1. Se activa por calor la Pfu DNA polimerasa, a una temperatura de 95°C durante dos minutos y se separan las hebras del DNA- templado.
2. Se mantiene la temperatura a 95°C un minuto más para que continúe la desnaturalización del DNA, esta etapa de desnaturalización se repetirá cada ciclo
3. Se inicia el alineamiento de los oligonucleótidos; se debe enfriar a una temperatura de 60°C, esta temperatura se obtuvo de la Tm de los oligonucleótidos, se tomó la temperatura ajustada a la más baja a la cual se le restan 5°C. Es necesario que esta temperatura sea alta, para que se evite la hibridación de los iniciadores a otros sitios del genoma.
4. La DNA polimerasa alarga los oligonucleótidos iniciadores, para sintetizar la cadena complementaria. Se utiliza una temperatura de 72°C porque en ésta es donde la enzima tiene mayor actividad.
5. Esta etapa de extensión final se hace para completar algún producto de PCR que haya quedado incompleto.

5.4. Electroforesis en gel de agarosa.

Para comprobar que el producto del PCR era el gen que se deseaba amplificar, se hizo correr en un gel al 0.8% de agarosa con un volumen de 100 mL totales y se le agregaron 6 μ L de Bromuro de etidio, agregándole a la muestra azul de bromofenol como indicador de corrida.

En este gel también se corrió un marcador de peso molecular de 1kb el cual nos indicó el tamaño del producto de PCR. El gel se colocó en una cámara de electroforesis, la cual contenía buffer TBE 0.5x (44.6 mM Tris, 1mM EDTA y 45 mM de ácido bórico) y se le aplicó una corriente de 100 volts.

Finalmente para poder observar el resultado del gel, se utilizó un transiluminador de luz U.V, debido a que el bromuro de etidio se intercala en las bases del DNA y es fluorescente cuando se expone a este tipo de luz.

5.5. Purificación del gen *HXT1*

Una vez comprobado, mediante electroforesis, que el peso del fragmento correspondía al número de bases del gen, se cortó la banda y se purificaron con el kit wizard SV gel and PCR clean up system (promega) que consiste en los siguientes pasos:

- Se adicionaron 10 μ L de membrane binding solution (Isotiocinato de guanidina y acetato de potasio) por cada 10 mg de gel de agarosa.
- Se incubaron a 65°C durante 10 minutos para disolver completamente el gel.
- Se transfirió el gel disuelto a una columna y se dejó reposar a temperatura ambiente durante un minuto.

-Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 700µL de membrane wash solution (Acetato de potasio, EDTA y etanol) para lavar la columna.

-Nuevamente se centrifugó y se lavó la columna una vez más con 500µL de membrane wash solution, descartando el sobrenadante una vez más.

-La columna se centrifugó de nuevo un minuto a 14000 rpm. para permitir la evaporación del etanol que pudiera quedar en la columna.

-Finalmente se eluye con 40µL de agua libre de nucleasas.

El fundamento de la técnica es que al calentar la mezcla con la solución membrane binding el gel se disuelve y el DNA es liberado, posteriormente siendo atrapado al ser transferido en la columna. La solución membrane binding y la agarosa son eliminados durante los lavados con membrane wash solution. Finalmente el DNA es recuperado al ser resuspendido en agua.

5.6. Ligación del gen *HXT1* al vector pJET

Una vez que se obtuvo el gen puro se realizó una ligación al vector pJET (Fermentas). La reacción se realizó añadiendo 10µL de buffer de reacción 2x, 4µL de producto de PCR, 5µL de agua libre de nucleasas y 1µL blunting DNA enzyme. Esta mezcla se incubó a 70°C por 5 min y se enfrió rápidamente en hielo. Posteriormente se le añadió 1µL del vector pJET y T4 DNA ligasa y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min.

Este vector fue de gran utilidad debido a que contiene un gen que es letal, el cual sólo puede ser interrumpido por la ligación del inserto de DNA al sitio de clonación, por esta razón al insertar el vector a las bacterias competentes los falsos positivos son casi nulos.

5.7. Transformación de bacterias

Se descongeló una alícuota de 200µL de bacterias competentes y se le añadieron 20µL de la mezcla de ligación, para posteriormente incubarlas 30 minutos en hielo; después de esta incubación las bacterias se sometieron a un choque térmico, se incubaron a 42 °C durante 45 segundos y después se colocaron en hielo 2 minutos. La incubación a 42°C permite que la membrana se haga más permeable y que el plásmido pueda entrar a la célula, el colocar a las células 2 minutos en hielo hará que los poros existentes en la membrana de las bacterias competentes se cierren evitando así la salida del plásmido.

Finalmente se añadieron 800 µL de medio LB (0,5% extracto de levadura, 1%NaCl y 1% de triptona) y se incubaron a 37°C durante 1 hora, esto con el fin de que las bacterias se recuperen del tratamiento térmico.

Para seleccionar las bacterias transformantes, se cosecharon las células a 3500rpm 5 minutos, se elimina el exceso de medio y se resuspende en el volumen resultante. Se plataron las bacterias en medio LB sólido con 0,1mg/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C toda la noche. Debido a que el plásmido contiene un gen de resistencia a ampicilina, el cual ayuda a la degradación de la misma, solo crecerán las bacterias transformantes.

5.8. Extracción del plásmido. Mini prep

Se picaron seis colonias y se sembraron en medio LB líquido con ampicilina, se dejaron crecer toda la noche y posteriormente se realizaron minipreps con el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega); se centrifugaron las bacterias a 3500 rpm por 5 min y el sobrenadante se desechó, al pellet de cada una de las colonias picadas se le agregó 250µL de una

solución para lisis de células (0,2M NaOH y 1% SDS), se incubó durante 5 minutos, posteriormente se le agregó una solución de proteasa alcalina y se incubó por 5 minutos, finalmente se añadió 350µL de solución de neutralización. La extracción de este plásmido es por medio de un lisis alcalina en donde los puentes de hidrógeno entre las cadenas complementarias del DNA del plásmido circular se rompen, por el pH alcalino, las cadenas permanecen cercanas ya que el enrollamiento de las dos cadenas no se ha perturbado grandemente, en contraste las cadenas lineales de DNA se liberan o se separan completamente. La renaturalización de los plásmidos circulares pequeños es rápida debido a que las cadenas están próximas, mientras que las moléculas lineales de DNA genómico se renaturalizan menos precisamente, formando redes o agregados que pueden ser removidos de la solución centrifugando.

Para eliminar el DNA genómico se centrifugó 10 minutos a 14000 rpm, se desechó el pellet y se colectó el sobrenadante. Se colocó el sobrenadante en una columna, se centrifugó 1 minuto a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 2 lavados con una solución para el lavado de columna (60% etanol, 60mM acetato de potasio, 8,3mM Tris-HCl pH 7,5 y 0,04 mM de EDTA pH 8) uno con 750µL y se centrifugó un minuto y el otro con 250µL y se centrifugó 2 minutos, esto se realiza para eliminar cualquier tipo de contaminante que pudiera haber quedado en el sobrenadante, se desecha el sobrenadante; finalmente se eluye la columna con 40µL de agua libre de nucleasas y se centrifuga a 14 000 rpm un minuto en un tubo limpio. Se obtuvieron 6 mini preps.

5.9. Digestión del plásmido pJET+ *HXT1*

Debido a que el plásmido pJET no es un vector de sobreexpresión para levadura, se realizó una digestión para obtener el gen *HXT1* y así poder subclonarlo a un vector para levadura.

Debido a que el gen contenía sitios de restricción para *Not I*, se realizó la digestión con esta enzima; se cortan las 6 minipreps obtenidas, las condiciones de la reacción para cada una de las miniprep fueron las siguientes: 2 µL de miniprep, 2 µL de buffer 3 New England 10x (100 mM NaCl, 5 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂ y 1 mM DTT pH 7,9), 2 µL de BSA 10x (100 µg/mL) y 13 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de enzima *Not I*, el tubo de reacción se incubó a 37°C durante 1 hora. Después de la incubación se corren las muestras en un gel de agarosa y de las muestras que se obtienen resultados positivos se corta la banda que correspondan al peso del gen y se purifican de acuerdo a las condiciones ya mencionadas anteriormente.

5.10. Desfosforilación del plásmido pRS426

Para poder realizar una mejor ligación del gen a este vector se realiza una desfosforilación, esto con el fin de quitar el fosfato de 5' del vector para evitar que el vector se cierre y así éste se pegara preferentemente al gen. Se añadieron 6 µL de pRS426 (**Christianson, 1992**) previamente digerido con *NotI*, 2 µL de Buffer de fosfatasa 10x (0,1M tris- HCl pH 7,5, 0,1M MgCl₂ y 1 mg/mL de BSA), 11 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de fosfatasa alcalina de camarón, se deja incubar 1 hora a 37°C y posteriormente 15 minutos a 65°C.

5.11. Ligación del gen *HXT1* a pRS426

Una vez obtenido el gen puro y con el plásmido desfosforilado, se realiza una ligación. La ligación se realizó agregando 5 µL de pRS426 digerido con *NotI* y desfosforilado, 2 µL de gen *HXT1* digerido con *NotI* y purificado del gel de agarosa, 2 µL de buffer T4 DNA ligasa 10x (50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 10mM de DTT y 1mM de ATP con un pH de 7,5) y 1 µL de T4 DNA ligasa. Se incubó a 16°C toda la noche.

El plásmido es un buen vector para la sobre-expresión de genes en levadura debido a que contiene el origen de replicación 2 micrones, lo que hace que se mantenga en el núcleo de la levadura en aproximadamente 15 copias.

Nuevamente se realizó una transformación de bacterias *E. coli* competentes con la mezcla de ligación pRS426+*HXT1* y se extrajo el plásmido de 12 colonias transformantes por medio del método de miniprep con las mismas condiciones descritas anteriormente.

5.12. Digestión para corroborar la identidad del gen

Una vez obtenido el plásmido de las bacterias competentes se realizó una digestión para corroborar que en el plásmido se encuentre el gen que deseamos sobre-expresar, para esto se obtiene el mapa de restricción del gen y del plásmido para así saber si el patrón de restricción concuerda con lo esperado, si es así se deduce que trabajamos con el gen adecuado.

Se realizaron 3 digestiones con enzimas diferentes con *Hind III*, *Eco RI* y con *NotI* (BioLabs).

Para *Hind III* se utilizaron las siguientes condiciones 2 µL de mini, 2 µL de buffer New England 2 (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂ y 1mM DTT a un

pH de 7,9), 15 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de enzima *Hind III*. Para la digestión con enzima *EcoRI* y *NotI* se ponen las mismas cantidades pero se usa como buffer el New England buffer para *EcoRI* (50mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂ y 0,025% de Tritón X-100 a un pH de 7,5) y para *NotI* se utilizó el buffer New England 3. Se incubaron a 37°C durante 2 horas; una vez transcurrido este tiempo, las muestras se corren en un gel de agarosa según las condiciones ya señaladas.

5.13. Secuenciación del gen

Para confirmar que el gen que se trabajó fuera el correcto, una alícuota del plásmido se sometió a secuenciación automática. Una vez obtenida la secuencia del gen se compara con la secuencia en la base de datos. De este modo podemos detectar mutaciones generadas durante la PCR y la identidad del gen.

5.14. Transformación de levaduras

Solo se tomó una de las muestras que resultaron positivas para la transformación de levaduras, cepa BY4741.

Se inocularon 10mL de medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona de caseína y 2% dextrosa anhidra) con cepa de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 y se incubaron a 30°C toda la noche con agitación constante. Ya que el tiempo de incubación transcurrió se centrifugaron a 3000rpm por 5 minutos a temperatura ambiente para colectar la células y se resuspendieron en 5mL de agua estéril, se diluyen en 40mL de medio YPD para alcanzar una densidad óptica 600nm de 0,2 a 0,3. Se incuban a 30°C a 250 rpm hasta alcanzar una

densidad óptica de 0,5 a 0,6; se centrifugan nuevamente a 3000rpm por 5 minutos. Se resuspendió el pellet en 10mL de TEL (Acetato de litio 0,1M, Tris-HCl 10mM pH 7,5, EDTA 1mM pH 8) se centrifugan nuevamente a 3000rpm, se deshecha el sobrenadante y el pellet se resuspende en 1 mL de TEL y se pasa a un tubo de microfuga, se centrifuga a 14000rpm por 5 segundos; finalmente las células se resuspenden en 200 μ L de TEL. Se colocaron tres tubos con 50 μ L de células cada uno y se le agregó al primero y al segundo tubo 10 μ L de DNA acarreador (esperma de salmón 10mg/mL, previamente hervido por 5 minutos) y solo al primer tubo se le agregó 1 μ g de plásmido pRS426+*HXT1*; al tercer tubo no se le agrega nada, para así poder tener dos controles uno sin DNA de ningún tipo y el otro solo con el DNA acarreador. A los tres tubos se les dará el mismo tratamiento en lo posterior.

Se le adicionaron 300 μ L de PLATE (Acetato de litio 0,1M, Tris-HCl 10mM pH 7,5, EDTA 1mM pH 8 y 40.5% de polietilenglicol) y se mezcló, se incubó a 30°C durante 60 min a 250 rpm. Una vez transcurrido este tiempo se someten a las células a un choque térmico a 42°C por 15 min, mezclándolos por inversión cada 3 minutos. Finalmente se centrifugan para eliminar el exceso de sobrenadante y se platan en medio mínimo HML sólido (0,1% vitaminas, 0,1% trazas de levadura, 2% sales, 2% de glucosa, 0,5% de sulfato de amonio, 0,02g/L histidina, 0,02g/L metionina y 0,1g/L de leucina). Las levaduras transformantes serán aquellas que crezcan en el medio, debido a que el plásmido contiene el gen que permite a las levaduras sintetizar uracilo, así aquellas que no tengan al plásmido no crecerán por ausencia de uracilo en el medio.

5.15. Extracción de RNA

Se inocularon los matracos los cuales contenían medio mínimo HML, con dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, la cepa silvestre con el plásmido pRS426 (By4741Ø) y la cepa que resultó positiva a nuestra transformación (By4741pCHXT1). Se dejaron crecer 16 y 24 horas.

Se utilizó el kit RNA easy mini (Qiagen), para la extracción del RNA.

Se centrifugaron 15 mL del medio de cultivo a una densidad óptica 600nm de 0,5 a 3000rpm durante 5 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante. Se lavó el pellet con 10 mL de agua fría, nuevamente se centrifugó y se eliminó el sobrenadante pipeteando el exceso de agua. Se mantuvo el pellet en hielo y se le adicionó 600 µL de buffer RLT-β mercaptoetanol al pellet para resuspender las células, posteriormente se le añadieron 600 µL de perlas de vidrio y se realizó la ruptura de las células dando seis ciclos de 1 minuto de agitación en el vórtex a máxima velocidad y 1 minuto en hielo. Una vez que se cumplieron los seis ciclos, se centrifuga a 14000 rpm durante 2 minutos, con ayuda de una jeringa nueva de 1 mL se extrajo el sobrenadante y se coloca en un tubo limpio, a éste se le adiciona 350 µL de etanol al 70%, esto con el fin de homogeneizarlo. Se transfirió la muestra a un columna de RNeasy se cerró la tapa de ésta y se centrifugó sobre un tubo colector a 14000rpm durante 15 segundos, se descartó el sobrenadante y se añadieron 700 µL de buffer RW1 a la columna, se centrifuga nuevamente. Posteriormente se adicionaron 500 µL de buffer RPE para lavar la membrana de la columna, se centrifuga; se realiza un lavado más y se centrifuga 2 minutos a 14000 rpm. Finalmente se colocó la columna en un tubo nuevo y estéril, y se adiciona 40 µL de agua libre de RNasas con esto se eluye el RNA total de la levadura.

5.16. Generación de cDNA

A partir del RNA se genera DNA de cadena sencilla utilizando el kit Improm II Reverse transcription system (Promega).

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

RNA total 4 μ L

Oligo dT 1 μ L

Se incubó el tubo de reacción a 70°C durante 5 minutos.

Posteriormente se le añadió

H₂O libre de RNAsas 4,5 μ L

Improm II buffer 5x 4 μ L

MgCl₂ 25mM 4 μ L

dNTP mix 1 μ L

Inhibidor de RNAsas 5 μ L

Transcriptasa reversa 5 μ L

Se configuró el termociclador con las siguientes temperaturas y tiempos, para que se pueda llevar a cabo la reacción de la transcriptasa reversa.

	Temperatura (°C)	tiempo (min)
1	25	15
2	42	60
3	70	15

5.17. RT-PCR semicuantitativo.

Debido a que la extracción de RNA y la obtención de cDNA, no es específica para el gen, se realizó un PCR donde se utilizaron como primers oligonucleótidos que se encontraban dentro de la región codificante del gen *HXT1*, esto con el fin de solo amplificar el cDNA obtenido del RNAm del gen.

Se realizó una PCR para el mRNA del gen constitutivo de *ACT 1* que codifica para actina, como control de carga, para igualar la cantidad de cDNA en cada reacción. Esto permitió una mejor comparación de las cantidades de mRNA de *HXT1*.

Los cDNA'S se amplificaron por 20 ciclos solamente, para asegurar que se realizaba la amplificación del gen en la parte lineal, es decir que la cantidad de DNA amplificado es proporcional a la cantidad de templado en la muestra, esto permitió comparar los niveles de mRNA.

Las condiciones de reacción para este PCR se muestran abajo para 3 muestras de la cepa silvestre (wt) y de las transformadas (pCHXT1).

H ₂ O	5 µL
Buffer Taq 10x sin MgCl ₂	5 µL
MgCl ₂ 25mM	5 µL
Primer Act Fo	5 µL
Primer Act Re	5 µL
dNTP's	1 µL
Taq	0,5 µL

cDNA variable. Depende de la muestra	μL
wt 1 _{16h}	0,7
wt 2 _{16h}	1
wt 3 _{16h}	0,7
pCHxt1 1 _{16h}	0,7
pCHxt1 2 _{16h}	2
pCHxt1 3 _{16h}	2
wt 1 _{24h}	2
wt 2 _{24h}	1
pCHxt1 1 _{24h}	1,5
pCHxt1 2 _{24h}	0,7
pCHxt1 3 _{24h}	1

La intensidad de las bandas de los PCR de ACT1 fueron iguales con diferentes μL para cada cDNA. Esas cantidades fueron las que se usaron para amplificar *HXT1*.

Las condiciones de la reacción para el gen *HXT1*:

H ₂ O	18,5 μL
Buffer Taq 10x sin MgCl ₂	2,4 μL
MgCl ₂ 25Mm	2,4 μL
Primer Hxt1 _{ORF} Fo	0,25 μL

Primer Hxt1 _{ORFRe}	0,25 μ L
dNTP's	1 μ L
Taq	0,25 μ L
<hr/>	
cDNA variable. Depende de la muestra	μL
wt 1 _{16h}	0,7
wt 2 _{16h}	1
wt 3 _{16h}	0,7
pCHxt1 1 _{16h}	0,7
pCHxt1 2 _{16h}	2
pCHxt1 3 _{16h}	2
wt 1 _{24h}	2
wt 2 _{24h}	1
pCHxt1 1 _{24h}	1,5
pCHxt1 2 _{24h}	0,7
pCHxt1 3 _{24h}	1

Con esas cantidades de cDNA, el amplificado del gen ACT1 fue aproximadamente igual. Por lo que se asumió que las cantidades de cDNA total eran similares, con lo cual las diferencias en intensidad de las bandas de *HXT1* eran indicativas de diferencias en cantidad de mRNA-*HXT1*.

Para ambos se utiliza el termociclador y se configura el programa con las siguientes condiciones:

	Temperatura (°C)	tiempo (min)
1	95	2
2	95	1
3	52	1
4	72	1 (repetir pasos 2,3 y 4; 21 ciclos adicionales)
5	72	10
6	4	Pausa

Por último se realizó una electroforesis en gel de agarosa, con las mismas condiciones ya mencionadas anteriormente.

5.18. Extracción de proteína para hibridación tipo western.

Se realizó un preinoculó en 2 matraces con 50mL de medio mínimo HML con las cepas silvestre y la recombinante (pCHXT1), se incubó a 30°C a 250 rpm durante toda la noche. Después que el tiempo de incubación se cumplió, se inocularon 2 matraces con medio fresco a una densidad óptica a 600 nm de 0,3, y se incubaron a 30°C a 250 rpm hasta obtener una densidad óptica de 0,6. Cuando llegaron a esta densidad tomaron 25mL y se transfirió a un tubo de 50 mL, el cual, contenía hielo hasta la mitad de su volumen; se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado y el pellet se resuspendió en 30 mL de agua helada, nuevamente se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Se le agregó 100 µL de cracking buffer (8 M urea, 5% SDS, 40mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1Mm EDTA y 0,4mg/mL de azul de bromofenol) y 5

μ L PMSF 100 mM. Se colocó el tubo 3 min en baño maría y posteriormente se adicionaron 60 μ L de perlas para darles 1 ciclo en el vortex de 2 minutos, para lisar todas las levaduras. Nuevamente se adicionan 5 μ L de PMSF y se coloca en hielo 5 minutos. Por último se centrifugan 1 minuto a 14 000rpm y se desecha el pellet.

5.19. Western blot

La proteína obtenida de ambas cepas se corrió en un gel desnaturante de poliacrilamida al 10% a 120 V durante 2 horas en un mortiguador TRIS-glicina-SDS.

Después de la corrida, el gel se transfirió a una membrana de PVDF (Millipore) durante 1 hora a 100mA, utilizando como amortiguador CAPS (ácido ciclohexilamino propanosulfónico)- metanol a 4°C.

Al terminar la transferencia se separó la membrana, se incubó en TBS (NaCl 136 mM, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM, 0.1% de Tween 20) con 2.5% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente, se enjuagó tres veces con TPBS y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario, el cual es un anticuerpo comercial que reconoce al transportador GLUT-1 de humano, diluido 1:3000 en TPBS+ 1% de leche descremada, durante toda la noche a 4°C. La membrana se enjuagó 2 veces con TPBS, se incubó durante 4 horas a 4°C con el anticuerpo secundario diluido 1:5000 en TPBS. Se lavó la membrana una vez con TPBS y dos veces con PBS (TPBS sin tween) durante 5 minutos.

Una vez lavada la membrana se cubrió durante 1 minuto con una mezcla de reactivos para revelar quimioluminiscencia. Se eliminó el exceso de reactivos y se reveló utilizando placas de autoradiografía.

5.20. Fermentaciones

Una vez que se comprobó la sobre-expresión del gen *HXT1*, se realizaron fermentaciones para comparar la cepa recombinante contra la cepa silvestre.

Se tomaron 3 colonias de tipo silvestre y 3 recombinantes (pCHxt1), se preinocularon en matraces de 50 mL con medio mínimo HML y se incubaron a 30°C a 250 rpm durante toda la noche. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se inocularon en medio fresco en frascos de micro aerofilia (frascos cerrados herméticamente con tapones de hule, llenos al 70% de su capacidad), con y sin benzoato de sodio (2mM) a una densidad óptica 600nm de 0,5.

Se dejaron crecer las levaduras durante 24 horas y se tomó como muestra 1 mL del medio cada dos horas, se centrifugaron las muestras y se desechó el pellet. Estas muestras fueron filtradas, y se les hizo una dilución 1:10 para posteriormente ser inyectadas al cromatógrafo de gases para determinar el etanol.

5.21. Transporte de glucosa

Para realizar el experimento de transporte de una manera adecuada es necesario, conocer la concentración de proteína en la cual no hay una saturación. Para esto se realizó una curva de proteína en donde se fijó una

concentración de glucosa (50mM) y las concentraciones de proteínas e variaron (10, 25, 50 y 100mg). Se incubaron los viales con diferentes concentraciones de proteína (las diluciones se realizan en agua) a 30° C, 5 minutos, esto se realizó para asegurarnos que toda la glucosa contenida dentro de la levadura se consumiera. Después que se cumplió el tiempo de incubación, se atemperaron las levaduras a 15°C durante 1 minuto. Finalmente se toma 1 mL y se añadió a un tubo de ensaye el cual contiene 50 mM de glucosa radiactiva (50000 CPM/1 μ L_{glucosa}), se incubaron 30 segundos y posteriormente se filtraron 800 μ L de la mezcla de reacción adicionándole 10 mL de glucosa no radiactiva 500 mM. El filtro se colocó en un vial y se añadió 5 mL de líquido de centelleo, como cuentas totales se tomaron 10 μ L de la mezcla de reacción y se le añadió líquido de centelleo. Se midió la radiactividad en un contador de centelleo.

Una vez que se obtuvo la concentración seleccionada de proteína (25mg), se realizó el experimento de abanico de glucosa, en este experimento se variaron las concentraciones de glucosa (10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 y 200 mM). El experimento se realizó de la misma forma que el de abanico de proteína.

5.22. Cuantificación de glucosa en el medio

Con la finalidad de obtener el rendimiento de la vía glicolítica se cuantificó la concentración de glucosa en el medio. Se coloca en una celda de cuarzo 1900 μ L de buffer MOPS pH 7 (50 mM), 10 μ L de Cloruro de magnesio (1 M), 10 μ L de ATP 400 Mm, 10 μ L de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa diluida 1:10 y 20 μ L de NADP 100Mm.

Finalmente se realizó el experimento agregando 1 μ L (sin diluir), 5 μ L (diluido 1:10) y 10 μ L (diluido 1:10) de medio de cultivo obtenido de las fermentaciones de la cepa recombinante (*pCHxt1*) y la cepa silvestre a las 24 y 48 horas.

Se inicia la reacción agregando 10 μ L de Hexocinasa diluida 1:10 y se cuantifica concentración de glucosa en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340nm.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de aumentar la capacidad de transporte de glucosa se clonó el gen *HXT1* en un plásmido de sobre-expresión, se transformó una levadura y se evaluó el efecto sobre la velocidad de producción de etanol.

6.1. Construcción del plásmido pCHxt1

Diseño de oligonucleótidos

Para amplificar el gen *HXT1* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se obtuvo la secuencia de la base de datos de *Saccharomyces cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org/>), en la cual están comprendidas, la región codificante del gen *HXT1* (letras gris claro), la región promotora de dicho gen (letras negras), la región terminadora (letras negras cursivas) y los oligonucleótidos (letras sombreadas).

```
GATAGAAGAATACCACTCATATGACGTGGCAGAAGACAGCAAACGTAAACATGAGCTGCTGCGACATTTGATG
GCTTTTATCCGACAAGCCAGGAACTCCACCATTATCTAATGTAGCAAAATATTTCTTAACACCCGAAGTTGCGTGT
CCCCCTCACGTTTTTAATCATTGAAATTAGTATATTGAAATTATATATAAAGGCAACAATGTCCCCATAATCAATCC
ATCTGGGGTCTCATGTTCTTTCCACCTTAAAATCTATAAAGATATCATAATCGTCAACTAGTTGATATACGTAAA
ATCATGAATTCAACTCCCGATCTAATATCTCCTCAGAAATCCAATTCATCCAACTCATATGAATTGGAATCTGGTCGT
TCAAAGGCCATGAATACTCCAGAAGGTAATAAATGAAAGTTTTACGACAACCTTAAGTGAAAGTCAAGTGCAACCC
GCCGTTGCCCTCAAACACCGGAAAAGGTGTCTACGTAACGGTTTCTATCTGTTGTGTTATGGTTGCTTTCCGGTG
GTTTCATATTTGGATGGGATACTGGTACCATTCTGGTTTTGTTGCTCAAACCTGATTTTCTAAGAAGATTGGTATG
AAGCACCACGACGGTAGTCATTAATCTGCAAGGTGAGAACTGGTTAATTGTCTCTATTTTAAACATTGGTTGTGC
CATTGGTGGTATCGTCTTAGCCAAGCTAGGTGATATGTATGGTCGTAGAATCGGTTTGATTGTCGTTGTAGTAATC
TACACTATCGGTATCATTATTCAAATAGCCTCGATCAACAAGTGGTACCAATATTTTATTGGTGTAGATTATCTCTGG
TTTAGGTGTCGGTGGTATCACAGTTTTATCTCCATGCTAATATCTGAGGTCGCCCCAGTGAAATGAGAGGCACC
TTGGTTTCATGTTACCAAGTCATGATTACTTTAGGTATTTTCTTAGGTTACTGTACCAATTTTGGTACCAAGAATTAC
```

TCAAACCTGTCCAATGGAGAGTTCCATTAGGTTTGTGTTTCGCCTGGGCCTTATTTATGATTGGTGGTATGATGTT
TGTTCTGAATCTCCACGTTATTTGGTTGAAGCTGGCAGAATCGACGAAGCCAGGGCTCTTTAGCTAAAGTTAAC
AAATGCCACCTGACCATCCATACATTCAATATGAGTTGGAACTATCGAAGCCAGTGTCGAAGAAATGAGAGCC
GCTGGTACTGCATCTTGGGGCGAATTATCACTGGTAAACCAGCCATGTTTCAACGTAATGATGGGTATCATGA
TTCAATCTCTACAACAATTAAGTGGTATAACTATTTCTTCTACTACGGTACCATTGTTTTCCAGGCTGTCGGTTTAA
GTGACTCTTTGAAACTTCTATTGTCTTTGGTGTGTCGCAACTTCTTCTCACTTGTGTTCTCTGTACACCGTTGACCG
TTTTGGCCGTCGTAAGTGTGATGTGGGGTGTGTCGGTATGGTCTGCTGTTATGTTGTCTATGCCTCTGTTGGTG
TTACCAGATTATGGCCAAACGGTCAAGATCAACCATCTTCAAAGGGTGTGTAAGTGTATGATTGTTTTCGCATG
TTTCTACATTTTCTGTTTCGCTACTACCTGGGCCCAATTGCTTACGTTGTTATTTTCAAGATGTTTCCCATTAAGAGTC
AAATCCAAGTGTATGTCTATTGCCAGTGTGCTAACTGGATCTGGGGTTTCTTGATTAGTTTCTTACCCCATTTATT
ACTGGTGCCATCAACTTCTACTACGGTTACGTTTTTATGGGCTGTATGGTTTTCGCTTACTTTTACGCTTTTTTCTTCG
TTCCAGAACTAAAGGTTTATCATTAGAAGAAGTTAATGATATGTACGCCGAAGGTGTTCTACCATGGAAATCAGC
TTCCTGGGTTCCAGTATCCAAGAGAGGGCGCTGACTACAACGCTGATGACCTAATGCATGATGACCAACCATTTTAC
AAGAGTTTGTGTTAGCAGGAAATAAACTAAACAAGCTCAATATGCATATTTAATGACTTATACAGTATTTAATTCT
CAGTAAATTTATAAAGGTGATATTATATTGGTGTAAAAACAAAATTCTGTCAAATTCATAAACAGATGTTCTTTTC
TTTGCTAGTTCTTGACCTTCACCAAGGAACAAGAAATTTTATTCTGGCACTCTCCGAGGAAA

Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando una herramienta en línea (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html), teniendo las siguientes características:

Sentido:

5'-GCGCGCGCGGCCGCGGATAGAAGAATACCACTCATATGACGTGG-3'

Longitud: 29 nucleótidos

Porcentaje de GC: 41%

T_m (ajustada a Sal): 67°C

Las primeras seis pares de bases del oligonucleótido son para facilitar la digestión del PCR directamente sin necesidad de clonarlo a un plásmido, las siguientes ocho bases corresponden al sitio de corte de la endonucleasa *NotI*, las siguientes 29 bases (sombreadas) son iguales al extremo 5' del promotor del gen *HXT1*.

Antisentido:

5'-GCGCGCGCGGCCGCTTT CCT CGG AAG AGT GCC AGA ATG-3'

Longitud: 24 nucleótidos

Porcentaje de GC: 50%

T_m (ajustada a Sal): 65°C

Las primeras seis pares de bases del oligonucleótido son para facilitar la digestión del PCR directamente sin necesidad de clonarlo a un plásmido, las siguientes ocho bases corresponden al sitio de corte de la endonucleasa *NotI*, las siguientes 24 bases son iguales a la hebra no codificante en el final del terminador.

A estos oligonucleótidos se les agregaron sitios *NotI*, para clonar el gen *HXT1* en el plásmido multicopia de la levadura.

Amplificación del gen HXT1 mediante PCR

Los genes se amplificaron a partir de DNA genómico con los oligonucleótidos antes mencionados y con el programa de PCR descrito en la metodología (5.3). En la PCR se realizan ciclos de calentamiento y enfriamiento, donde se agrega

una concentración en exceso de oligonucleótidos para evitar que la secuencia de DNA se hibride entre si.

Posteriormente se separó el producto de la PCR por medio de una electroforesis en gel de agarosa, para comprobar que el gen HXT1, el cual consta de 2216 pares de bases, fue amplificado correctamente. En la figura 6.1 se muestra dicho gen revelado en luz UV donde se observó que el peso de la producto de PCR corresponde al peso del gen obtenido de la base de datos, además de que solo se observó una banda, por lo que se sabe que los oligonucleótidos son específicos para el gen.

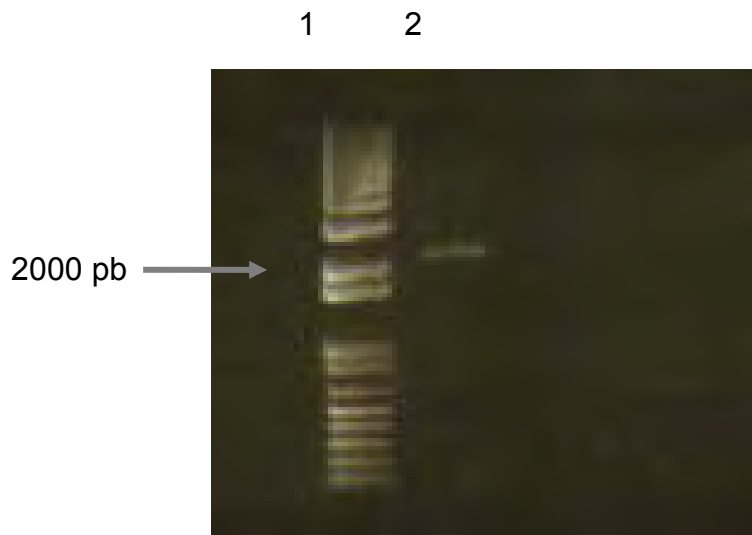


Fig. 6.1. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 2: Muestra obtenida del PCR.

Se realizó una purificación de la banda con el fin de eliminar fragmentos de DNA o algún contaminante no deseado, al purificar se obtiene nuevamente una banda por arriba de 2000pb más definida, pero con menor fluorescencia.

Clonación del gen HXT1 al plásmido pRS426

Una vez que se obtiene la banda purificada del gen, se realiza la ligación de éste al plásmido pJET como se menciona en la metodología. Debido a que, este plásmido contiene un gen letal que solo es interrumpido con la ligación del gen al sitio de clonación, no fue necesario realizar un control.

Para obtener suficiente cantidad de plásmido se insertó el vector pJET con el gen del transportador HXT1 a bacterias *E. coli* DH5 α , previamente tratadas con agentes que ocasionan el aumento en su permeabilidad membranal, lo cual disminuye la repulsión de cargas eléctricas entre los fosfatos de los nucleótidos y la membrana facilitando la entrada del plásmido. Se platearon las bacterias y transformadas en medio LB sólido con ampicilina. Las bacterias que contenían el plásmido fueron las que sobrevivieron a estas condiciones; las colonias transformantes que se obtuvieron fueron incontables (>10 UFC). Se picaron 6 colonias y se obtuvo el plásmido por medio de lisis alcalina.

Para corroborar que el plásmido tuviera el inserto se realizó una digestión con la enzima *NotI*, la cual libera al inserto del plásmido; la fig. 6.2 muestra el patrón de restricción de distintas colonias, comparadas con el marcador de peso molecular (C1), los carriles 2, 4, 5, 6 y 7 corresponden a colonias que contienen al inserto donde se observan 2 bandas, una correspondiente al peso de pJET (2974pb) y otra al del inserto (2216pb), mientras que en el carril 3 la colonia no cumplió con el patrón esperado, debido a que solo se observa la banda correspondiente al peso del plásmido.

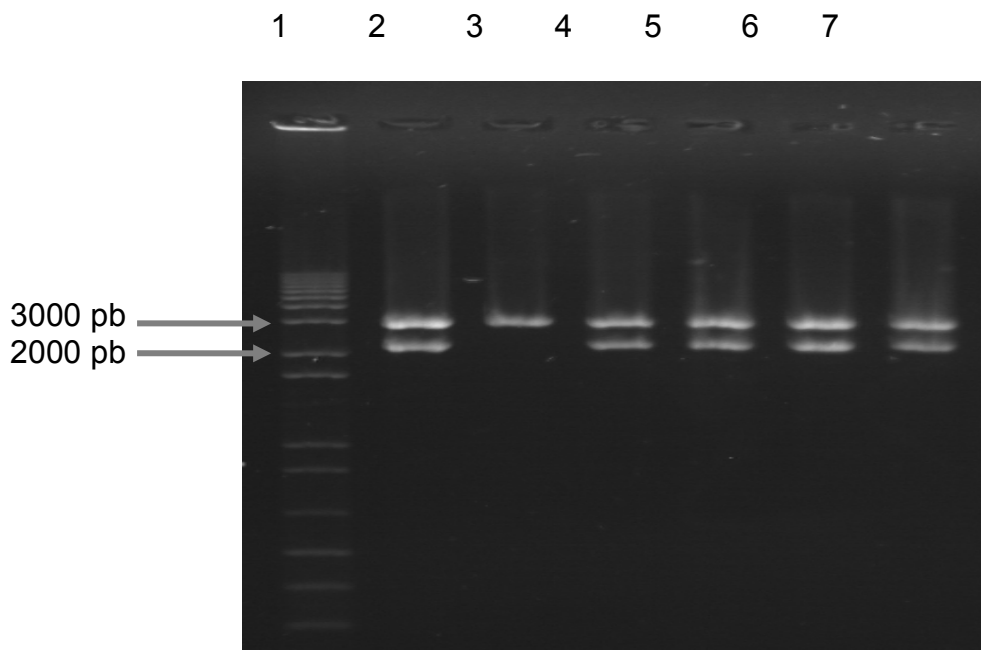


Fig. 6.2 Patrón de digestión con la enzima *NotI* de 6 minipreps (pJET+HXT1). Carril 1. marcador de peso; Carril 2-6. Minipreps.

De una de las positivas, en este caso se tomó la colonia 4, se cortó la banda del gen y se purificó.

Para subclonar el gen en el plásmido pRS426 fue necesario que a éste se le diera el mismo tratamiento que a pJET, es decir, se digirió con la enzima *NotI*. Se subclonó el gen ya purificado en el plásmido multicopia, como se indica en la metodología y para obtener una mayor cantidad del mismo se transformaron nuevamente bacterias *E. coli*.

6.2. Verificación de la identidad

Para corroborar la identidad del gen y para comprobar que el inserto fue ligado al plásmido se realizó una digestión con la enzima *NotI*, al igual que en pJET la digestión hará que el inserto se libere del vector. En este caso el patrón de

digestión debió ser el peso del plásmido pRS426 (5726 pb) y el del gen *HXT1* (2216pb). Se pusieron como controles plásmido pRS426 cortado con *NotI*, *EcoRI* y sin digerir, además de pRS426+*HXT1* sin cortar, para comprobar que la digestión fue adecuada.

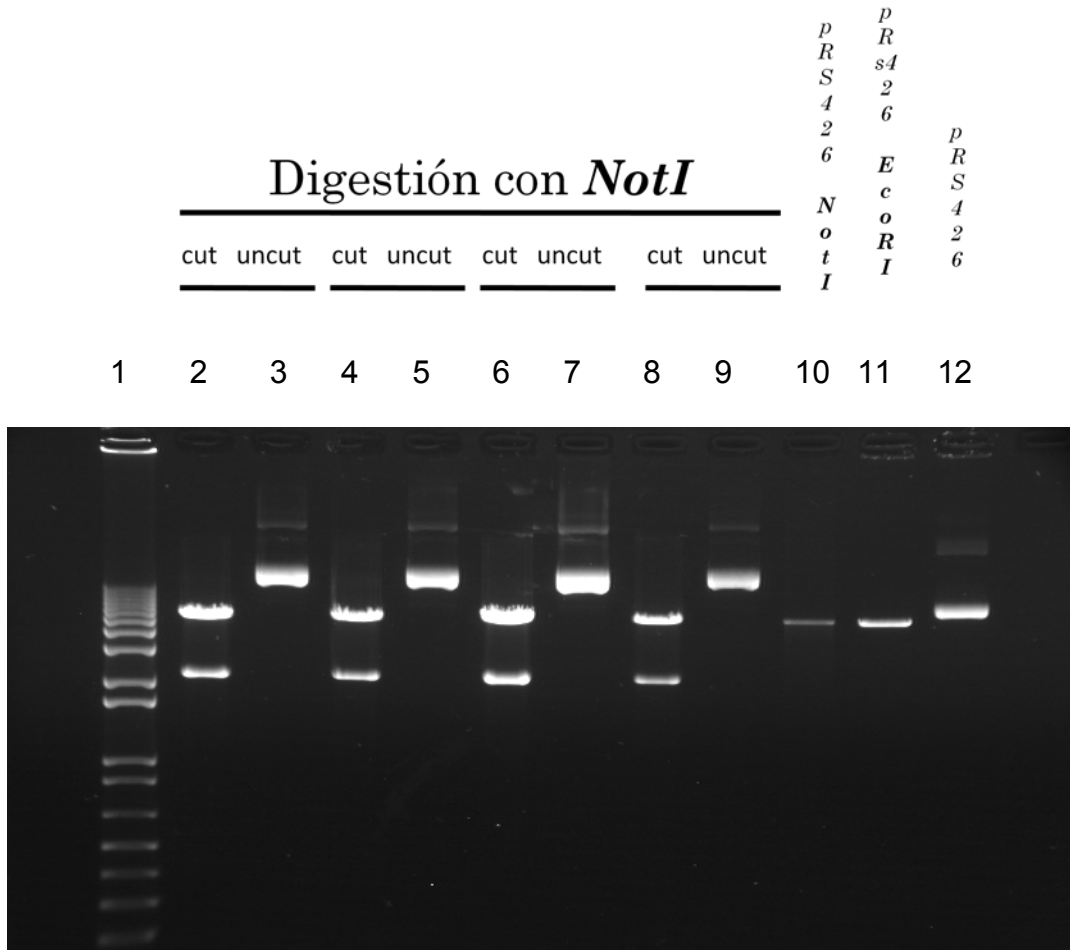


Fig. 6.3 Digestión diagnóstico con *NotI*. Carril 1. Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 2 -9 minipreps digeridas y no digeridas. Carril 10 -12 pRS426 digerido y no digerido.

En la figura 6.3 se observa que todas las clonas cumplieron con el patrón de restricción esperado para la construcción genética, en la figura 6.4 se ilustra el resultado de la construcción genética, es decir el plásmido multicopia para levadura con el gen de *HXT1* clonado.

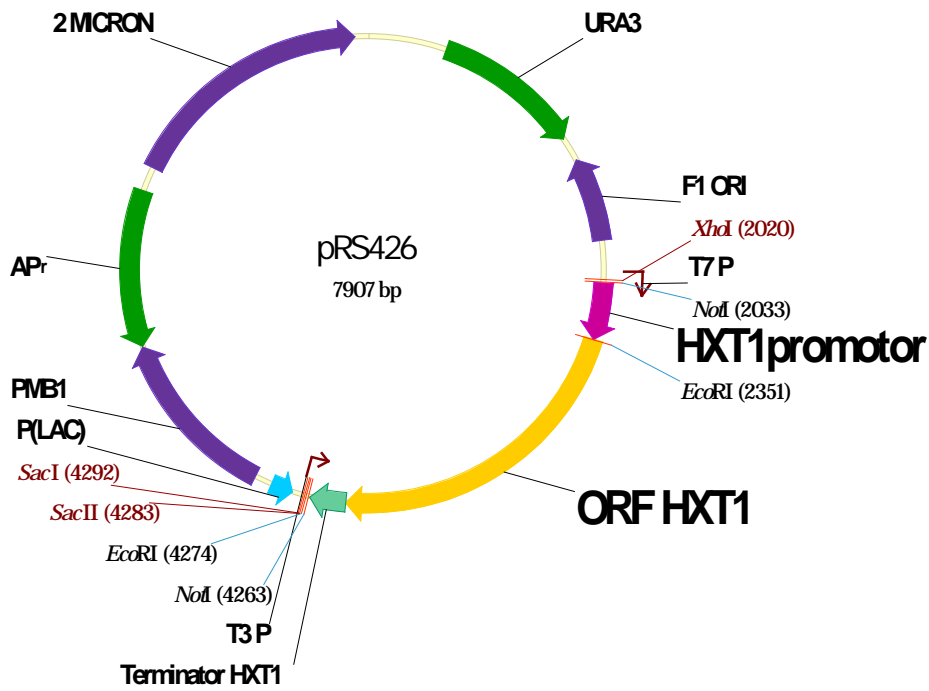


Fig. 6.4 Construcción genética del plásmido multicopia pRS426+HXT1

Secuencia del gen HXT1

Con el fin de asegurar la identidad del gen se tomó una de las clonas positivas y se realizó una secuenciación automática de nucleótidos, se tradujo la secuencia y se compararon los resultados con la secuencia obtenida en la base de datos de *Saccharomyces cerevisiae*, al realizar la alineación entre las dos secuencias se obtuvo un porcentaje de identidad del 99.6%, debido a que hubo cambios en 2 aminoácidos, arginina por lisina y metionina por valina, la comparación es la siguiente:

```

hxt1b  MNSTPDLISPQKSNSSNSYELESGRSKAMNTPEGKNESFHDNLSSESQVQPAVAPPNTGKG
      .....
HXT1C  MNSTPDLISPQKSNSSNSYELESGRSKAMNTPEGKNESFHDNLSSESQVQPAVAPPNTGKG
      10          20          30          40          50          60
  
```

	70	80	90	100	110	120
hxt1b	VYVTVSICCVMAVAFGGFIFGWDGTISGFVAQTDFLRFRFGMKHHDGSHYLSKVRTGLIVS					
					
HXT1C	VYVTVSICCVMAVAFGGFIFGWDGTISGFVAQTDFLRFRFGMKHHDGSHYLSKVRTGLIVS					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
hxt1b	IFNIGCAIGGIVLAKLGDMYGRRIGLIVVVVIYTYGIIIIQIASINKWYQYFIGRIISGLG					
					
HXT1C	IFNIGCAIGGIVLAKLGDMYGRRIGLIVVVVIYTYGIIIIQIASINKWYQYFIGRIISGLG					
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
hxt1b	VGGITVLSPMLISEVAPSEMRTLVSVCYQVMITLGIIFLGYCTNFGTKNYSNSVQWRVPLG					
					
HXT1C	VGGITVLSPMLISEVAPSEMRTLVSVCYQVMITLGIIFLGYCTNFGTKNYSNSVQWRVPLG					
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280	290	300
hxt1b	LCFAWALFMIGGMFVPEsprylVEAGRIDEARASLAKVNKCPPDHPYIQYELETIEASV					
					
HXT1C	LCFAWALFMIGGMFVPEsprylVEAGRIDEARASLAKVNKCPPDHPYIQYELETIEASV					
	250	260	270	280	290	300
	310	320	330	340	350	360
hxt1b	EEMRAAGTASWGELFTGKPAMFQRTMMGIMIQLQQLTGDNYFFYYGTIVFQAVGLSDSF					
					
HXT1C	EEMRAAGTASWGELFTGKPAMFQRTMMGIMIQLQQLTGDNYFFYYGTIVFQAVGLSDSF					
	310	320	330	340	350	360

```

          370          380          390          400          410          420
hxt1b  ETSIVFGVVNFFSTCCSLYTVDRFGRRNCLMWGAVGMVCCYVVYASVGVTRLWPNQDQP
      :
HXT1C  ETSIVFGVVNFFSTCCSLYTVDRFGRRNCLMWGAVGMVCCYVVYASVGVTRLWPNQDQP
          370          380          390          400          410          420

          430          440          450          460          470          480
hxt1b  SSKGAGNCMIVFACFYIFCFATTWAPIAYVWISECFPLRVKSKCMSIASAANWIWGFLIS
      :
HXT1C  SSKGAGNCMIVFACFYIFCFATTWAPIAYVWISECFPLRVKSKCMSIASAANWIWGFLIS
          430          440          450          460          470          480

          490          500          510          520          530          540
hxt1b  FFTPFITGAINFYGYVFMGCMVFAYFYVFFVPEVKGLSLEEVNDMYAEGVLPWKSASW
      :
HXT1C  FFTPFITGAINFYGYVFMGCMVFAYFYVFFVPEVKGLSLEEVNDMYAEGVLPWKSASW
          490          500          510          520          530          540

          550          560          570
hxt1b  VPVSKRGADYNADDLMHDDQPFYKSLFSRK
      :
HXT1C  VPVSKRGADYNADDLMHDDQPFYKSLFSRK
          550          560          570

```

hxt1b corresponde a la secuencia obtenida de la base de datos y HXT1C corresponde a los resultados obtenidos de la secuencia real del gen con que se trabajó.

Conociendo esto, se esquematizó el cambio en los aminoácidos dentro del transportador de glucosa, de acuerdo al diagrama obtenido de la literatura (fig. 6.5 Kasahara Toshiko et. al, 2006).

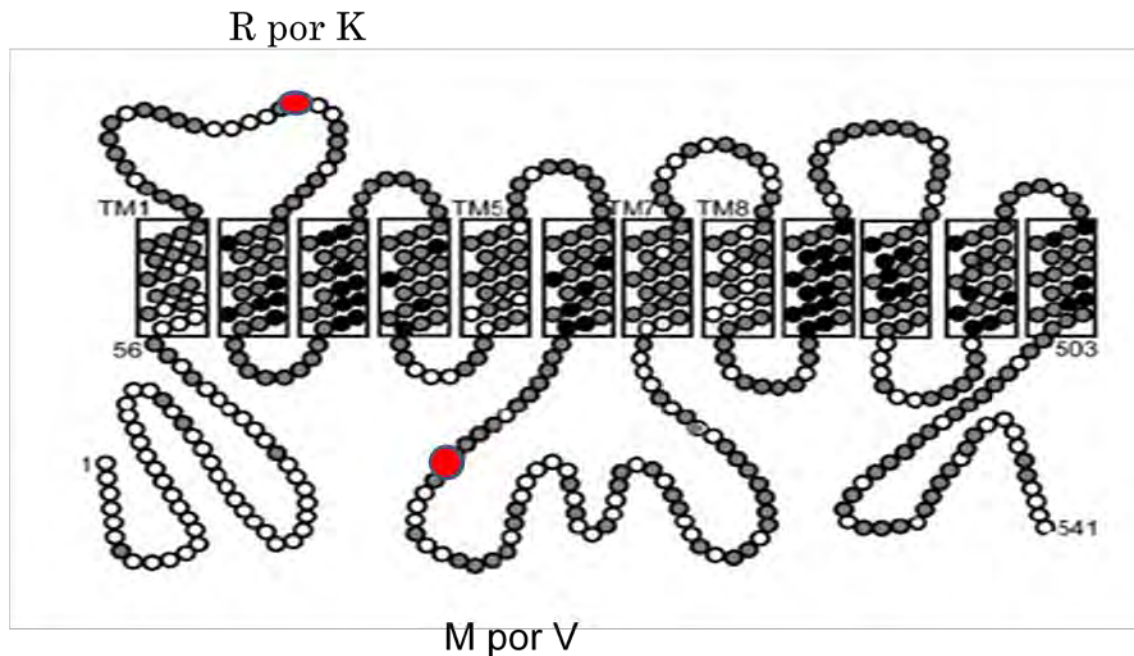


Fig. 6.5 Diagrama del transportador de glucosa, con los cambios de aminoácidos generados durante la construcción genética.

En la figura 6.5 se muestra que los cambios en los aminoácidos se encuentran dentro de los loops y no en las regiones transmembranales; debido a esto y a que los aminoácidos pertenecen al mismo grupo que los originales, se asumió que dichos cambios no afectarán la afinidad por el sustrato ni la velocidad de transporte de glucosa.

6.3. Transformación de levaduras

Una vez comprobada la identidad del gen, se realizó la transformación de levaduras con sus respectivos controles como se menciona en la metodología (5.14). En los controles, es decir donde solo se le agregó a las levaduras DNA acarreador y donde no se le añade ningún tipo de DNA, no hay crecimiento de las levaduras; por otro lado en la caja donde se sembraron levaduras a las cuales se le agregó DNA acarreador y el plásmido pRS426+*HXT1*, hubo un número de colonias incontables. Esto es debido a que la cepa utilizada (By4741) es auxótrofa a histidina, leucina, metionina y uracilo; y debido a que el medio de cultivo no contiene uracilo, solo crecerán aquellas que contengan al plásmido, ya que éste contiene al gen *URA3* el cual le permite a la cepa generar uracilo. A las transformantes se les nombró pCHXT1.

6.4. Sobre-expresión del gen *HXT1*

Medición de transcritos por RTPCR semicuantitativo

Para comprobar la sobre-expresión del gen, se midieron los transcritos mediante RTPCR. En este procedimiento se extrajo RNA total y se generó cDNA como se menciona en la metodología (5.17), para amplificar específicamente el cDNA correspondiente al mRNA del gen *HXT1*, se realiza una PCR utilizando como oligonucleótidos dentro del ORF del gen *HXT1*, con lo cual se pudo medir indirectamente el RNA mensajero.

En la figura 6.6 se muestra que en la banda correspondiente a actina, la cual es control de carga, ésta presenta una intensidad similar para cada una de las

muestras, por lo cual se sabe que la cantidad de cDNA cargado es igual para todas las muestras.

La banda inferior corresponde al producto de PCR, obtenido a partir del cDNA con oligonucleótidos dentro del ORF del gen *HXT1*. Al comparar las bandas de la cepa recombinante y la cepa silvestre a las 16 h y 24 h, se observó que la cepa recombinante pCHxt1 muestra mayor intensidad en sus bandas para cada una de las muestras, lo que indica que la cepa recombinante tiene una mayor concentración de transcritos (RNA mensajero) que la cepa silvestre, por lo cual se comprobó la sobre-expresión y la permanencia de éste a las 24 horas.

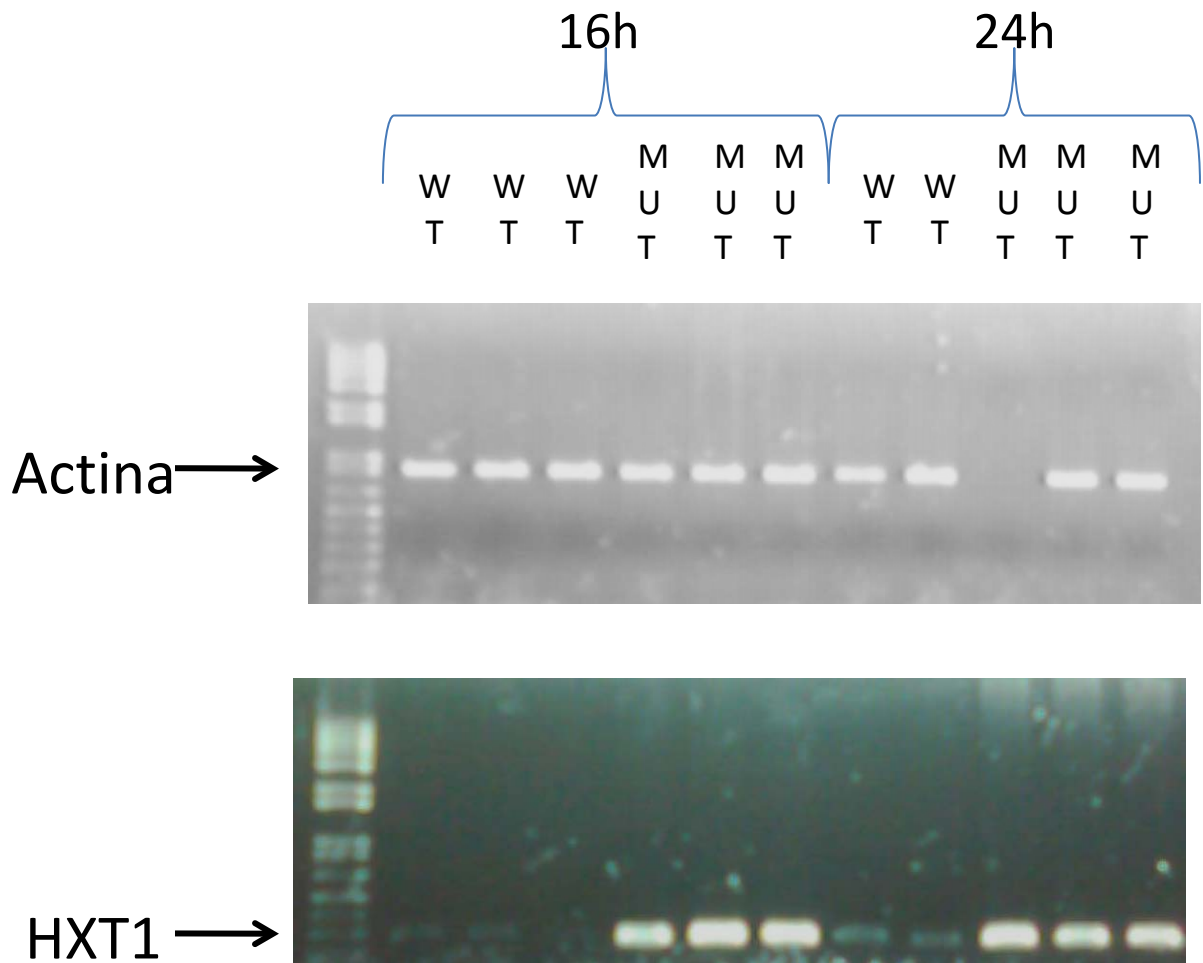


Fig. 6.6 Electroforesis en gel de agarosa para los transcritos del gen *HXT1*.

Sobre-producción de la proteína

Se midió la producción de proteína mediante la técnica de western blot, en la cual se utilizaron anticuerpos de los transportadores de glucosa GLUT-1, 2, 3,4 de humano; debido a que, aunque y a se sabe que la producción de los transcritos es mayor en la recombinante, en algunos casos dichos transcritos se degradan y la proteína es similar para las cepas silvestre y recombinante.

En la figura 6.7 (B) se muestra el gel de proteína total, donde se observa la misma intensidad en cada una de las bandas, por lo cual se sabe que se cargó la misma concentración de proteína para ambas cepas, con lo que se pudo realizar una mejor comparación entre éstas.

Al colocar el anticuerpo GLUT-1 (fig. 6.7 A) se observa una banda con mayor intensidad, lo que indica que hay una mayor producción de proteína *Hxt1* en la cepa pCHXT1 que en la silvestre; esto demuestra que los transcritos producidos no están siendo degradados y todos estos generan proteína.

En donde se agregan los otros anticuerpos (GLUT-2, 3, 4) se observa, para GLUT-2 una banda con muy poca intensidad y para GLUT-3 y 4 no se observa ninguna banda, esto es debido a que estos anticuerpos no son específicos para levadura por lo que pudiera ser que no reconocieron a los transportadores.

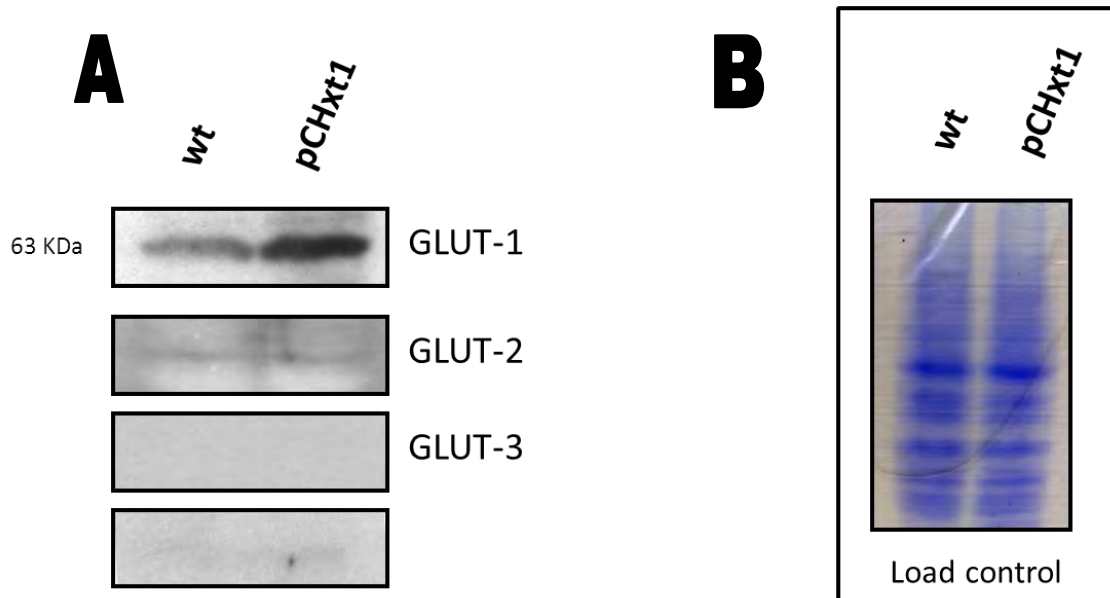


Fig. 6.7 A: Comparación del western blot de la cepa silvestre (wt) y la cepa recombinante (pCHxt1); B: Control de carga, proteína total.

6.5. Fermentaciones

Una vez que se supo que la construcción genética era la deseada y que el gen fue sobre-expresado en la levadura, se realizaron fermentaciones con y sin benzoato de sodio 2 mM, con el fin de conocer si la sobre-expresión del gen *HXT1* y la demanda de ATP ayudaban al aumento en la velocidad de producción de etanol.

Las fermentaciones se realizaron durante 24 horas, tomando 1 mL de muestra cada dos horas. Con esta muestra se realizó una curva de crecimiento, se midió etanol y consumo de glucosa.

Curva de crecimiento.

Se realizó una curva de crecimiento del cultivo midiendo la densidad óptica a 600nm cada dos horas.

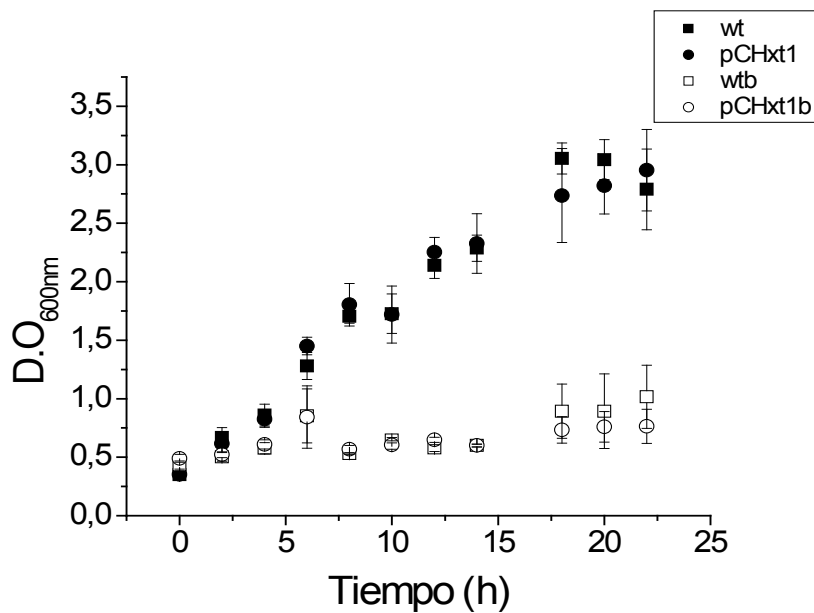


Fig. 6.8 Curva de crecimiento cepa recombinante (pCHxt1) y cepa silvestre (wt). wtb y pCHxt1b fueron cultivadas en medio con 2mM de benzoato.

En la gráfica se observa que la densidad óptica de las cepas (recombinante y silvestre) es similar en las mismas condiciones, es decir si se comparan en medio con o sin benzoato de sodio, por lo cual podemos decir que éstas crecen de manera muy similar. Sin embargo se observa que la densidad óptica de las que fueron sembradas en medio con benzoato de sodio es mucho menor que las sembradas en medio sin benzoato.

Velocidad específica de crecimiento.

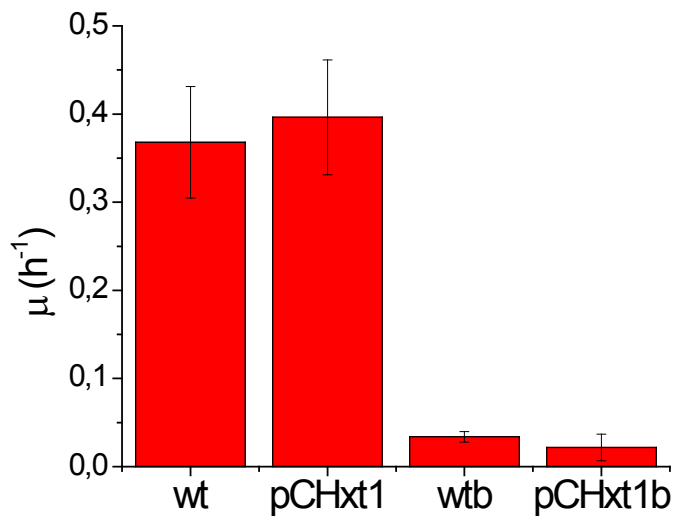


Fig. 6.9 Gráfica de velocidad específica de crecimiento

Se muestra que las velocidades específicas de crecimiento son similares entre las cepas sembradas bajo las mismas condiciones, sin embargo en aquellas las cepas que fueron sembradas en un medio con 2 mM de benzoato de sodio la velocidad específica de crecimiento (μ) disminuye de manera drástica, esto es debido al estrés generado, el benzoato de sodio provoca la hidrólisis del ATP para mantener el pH intracelular, debido a esto la levadura no cuenta con suficiente energía para generar biomasa.

Producción de etanol.

Se determinó la producción de etanol de las muestras tomadas a lo largo de la fermentación (cada 2 horas), con el fin de conocer la concentración de este en las diferentes etapas de crecimiento de la levadura.

En la figura 6.10 se observa que la producción de etanol, entre la cepa que sobre-expresa el transportador *HXT1* y la cepa silvestre bajo las mismas condiciones es igual. Esto indica que aunque la sobre-expresión del transportador es muy notable, éste no ejerce una influencia en la velocidad de producción de etanol, lo cual indica que el transporte de glucosa en las condiciones en las que se realizó la fermentación no es un paso limitante dentro de la vía glicolítica.

Sin embargo aun cuando las cepas cultivadas con benzoato de sodio no crecieron con la misma velocidad que las que no lo tenían, alcanzaron la misma concentración molar final de etanol.

Además se observa que al normalizar la concentración de etanol por número de células, hay un incremento en la producción de etanol en las cepas que contenían benzoato de sodio en el medio, esto nos indica que la adición de benzoato de sodio al medio incrementa la velocidad de producción de etanol, debido a que éste al entrar al citosol se desprotona acidificando el medio intracelular, la levadura para contrarrestar la acidificación activa su ATPasa en la membrana plasmática para bombear los protones fuera del citosol, lo cual generará que el ATP pierda un grupo fosfato generando ADP, por lo cual aumentará la demanda de ATP y por lo tanto la velocidad de glicólisis.

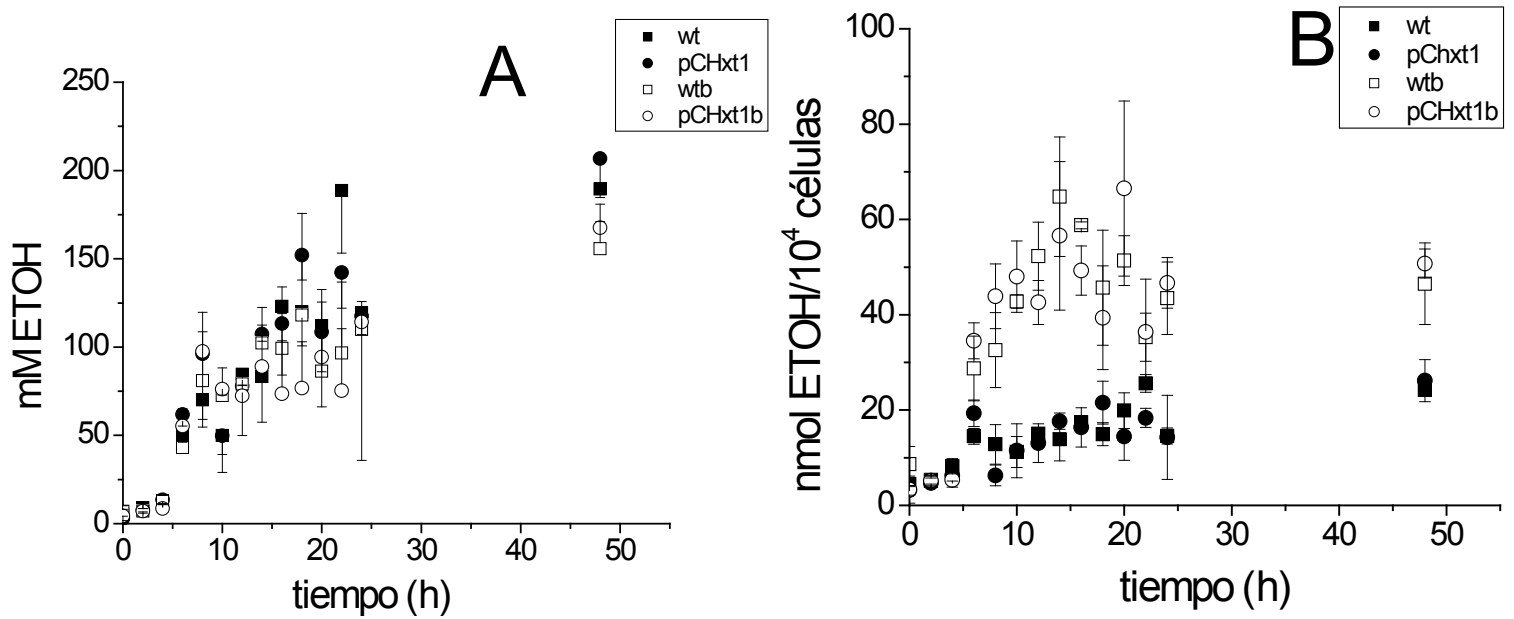


Fig. 6.10 Producción de etanol expresada en concentración mili molar y normalizada por número de células. wtb y pChxt1b fueron cultivadas en 2 mM de benzoato.

Se calcularon las pendientes en la gráfica 6.10 B para conocer la velocidad de producción de etanol en la fase exponencial y en la estacionaria.

En la tabla 6.1 se muestran las pendientes de cada una de las cepas en las diferentes condiciones, se observa que las cepas que crecieron en medio con benzoato de sodio tienen una velocidad mayor en fase exponencial que las que no lo contenían, sin embargo en la fase estacionaria la pendiente resultó negativa, una de las posibles explicaciones a esto es, que debido al gran estrés generado por el benzoato de sodio y debido a que la glucosa en esta fase es muy escasa, las levaduras son incapaces de contenerse contra la acidez y comienzan a morir.

Tabla 6.1 Velocidad de producción de etanol

	Fase exponencial (nmol/h*10 ⁴ células)	Fase estacionaria (nmol/h*10 ⁴ células)
wt	0,828	0,401
pCHxt1	0,793	0,495
wtb	2,503	- 0,126
pCHxt1b	1,244	- 0,169

En la figura 6.11 se observa que la cepa que se cultivó en un medio sin benzoato de sodio hay un ligero incremento en el consumo de glucosa comparada con la que se cultivó en presencia de benzoato, esto puede deberse a que en ausencia de benzoato de sodio, las células fueron capaces de utilizar la glucosa para generar biomasa, mientras que en presencia de benzoato el crecimiento fue muy poco (**fig. 6.8**). El ATP producido por la glicólisis se utilizó fundamentalmente para contener contra el estrés por benzoato y no hubo suficiente para la generación de biomasa.

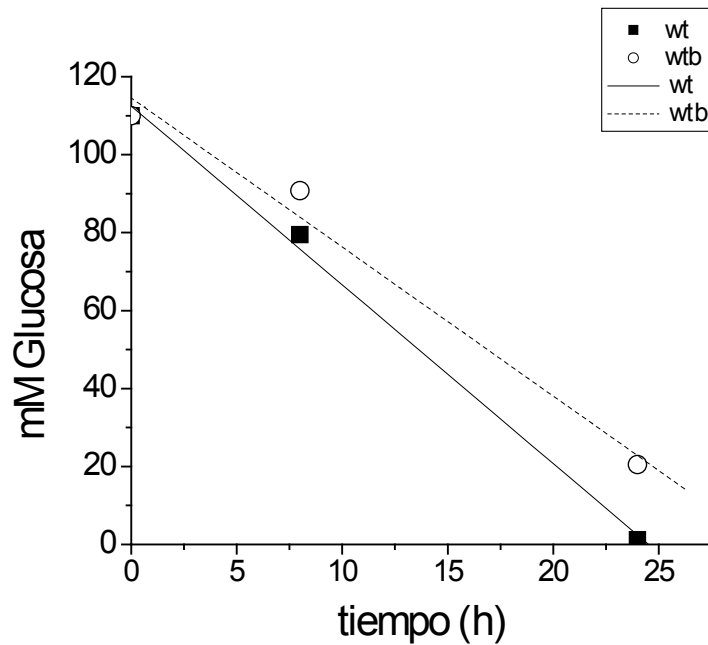


Fig. 6.11 Gráfica de consumo de glucosa de la cepa silvestre con y sin benzoato

6.6. Transporte de glucosa.

Abanico de proteína celular.

Se realizó un ensayo de transporte con el fin de comparar la velocidad en la cepa silvestre y la recombinante pCHxt1. Observando así si la sobre-expresión del transportador generó una mayor capacidad de transporte de glucosa.

Para la realización del ensayo de transporte fue necesario encontrar la cantidad de células adecuadas expresada como mg de proteína ($1,2 \times 10^7$ células = 34,8 mg de proteína)

En la figura 6.12 se observan las curvas con las diferentes cantidades de proteína, se realizó dicha curva en fase exponencial con células cultivadas en

10 mM de glucosa debido a que en estas condiciones es donde el transportador de glucosa *HXT1* se encuentra más activo.

De estas curvas se eligió la concentración de 25 mg de proteína como la adecuada para la realización del ensayo de transporte, debido a que ésta se encuentra en la fase lineal de la curva y con ella no se llega a la saturación.

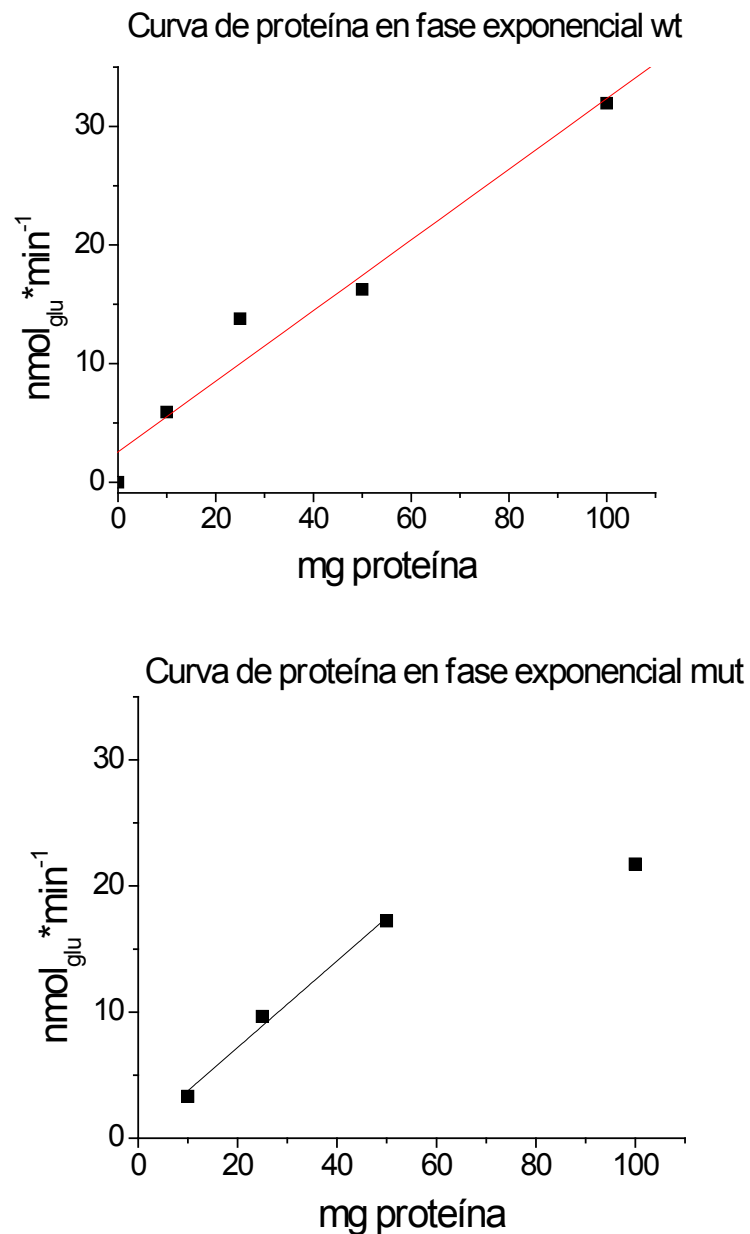


Fig. 6 .12. Abanico de proteína en fase exponencial. Cepa silvestre y recombinante.

Abanico de glucosa.

Ya que se conoció la cantidad de proteína adecuada, se realizó el ensayo de transporte variando la concentración de glucosa.

En la figura 6.13 se observa que la curva presenta dos fases la primera parece saturarse en 50 mM de glucosa, esto puede ser debido a que la levadura tiene dos diferentes tipos de transporte: de alta y baja afinidad (**Özcan, 1999**).

A concentraciones menores a 100 mM la velocidad de transporte fue similar entre la cepa control (WT) y la que sobre-expresa al gen *HXT1* (pCHxt1); sin embargo se encontraron diferencias significativas a 100 y 150 mM.

A la máxima concentración probada de 200 mM no se detectaron diferencias.

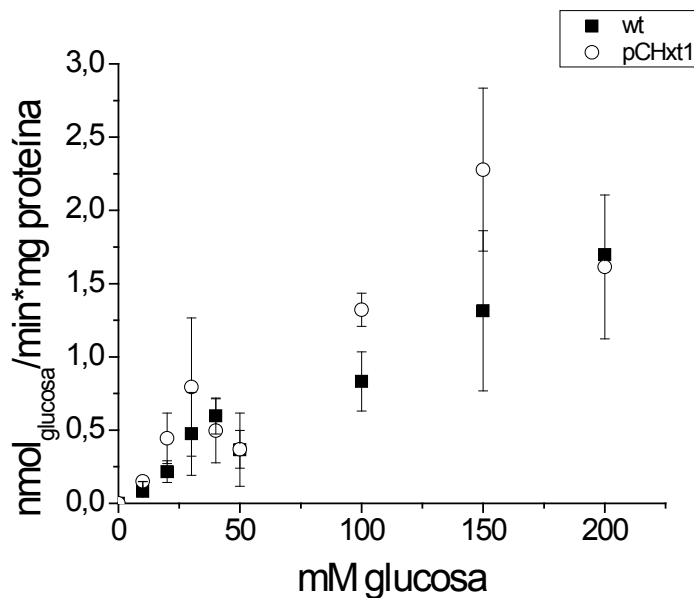
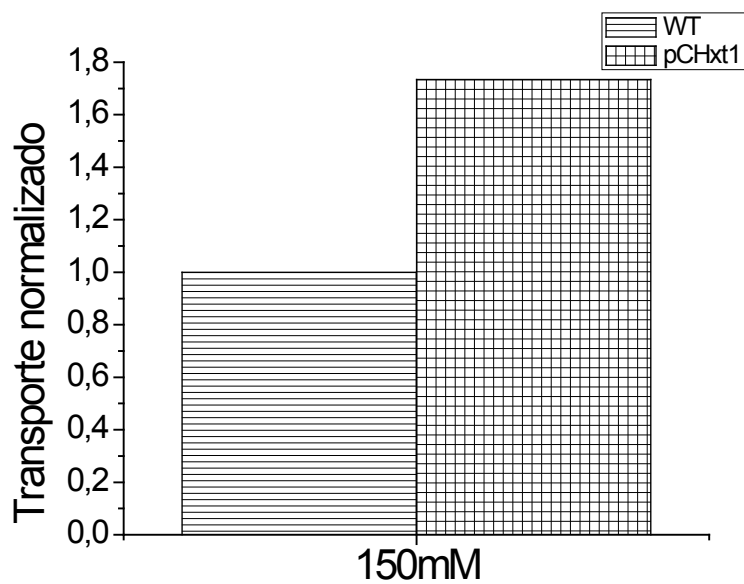
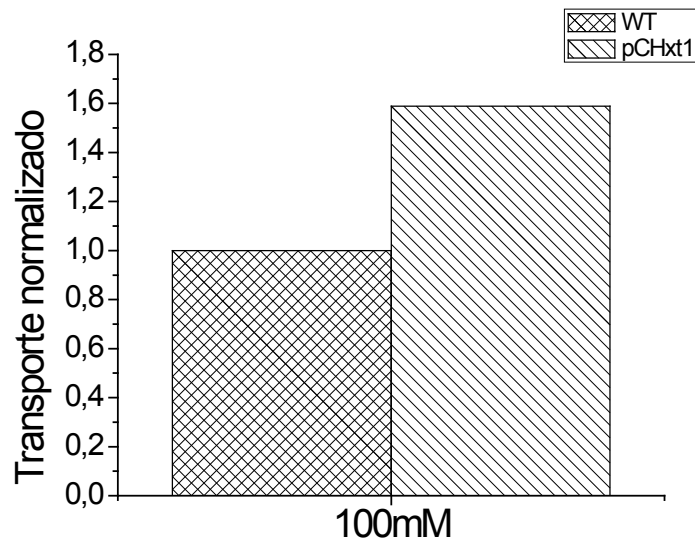


Fig. 6.13 Curva de transporte, abanico de glucosa.

Se realiza una normalización de los promedios obtenidos en el experimento realizado a las concentraciones de 100, 150 y 200 mM para poder observar mejor la diferencia de velocidad entre las cepas.



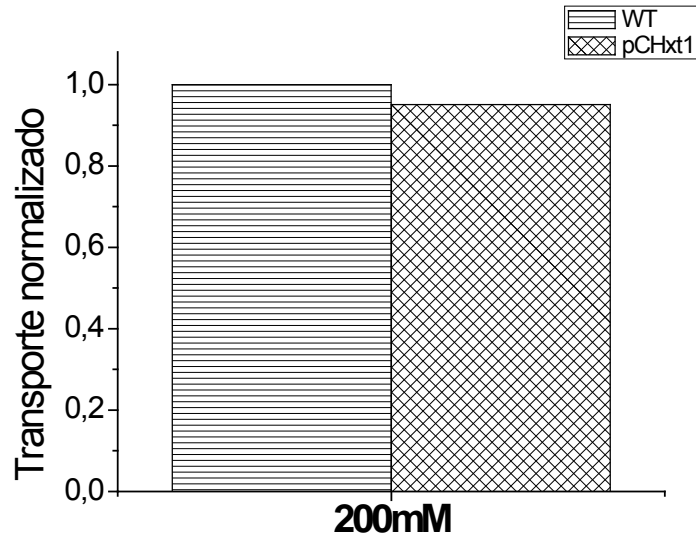


Fig. 6.14 Gráfica de barras. Transporte normalizado.

En la figura 6.14 se observa que hay un aumento de 58% en la velocidad de transporte a una concentración de 100 mM y un incremento del 73% en una concentración de 150 mM, sin embargo se observa que a una concentración de 200 mM no se detectaron diferencias probablemente debido a la saturación del sistema de detección utilizado ya que las cuentas en el detector de centelleo eran muy altas (16423cpm).

Para conocer si estadísticamente hay diferencia significativa entre las cepas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia α 0,05.

Se generó la siguiente hipótesis:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_i: \mu_1 \neq \mu_2$$

Tabla 6.2. Análisis de varianza para cepa wt y pCHxt1 en 100, 150 y 200mM.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>	
Entre grupos	0,47993054	1	0,47993054	17,8448936	0,00553475	5,98737758	Se rechaza
Dentro de los grupos	0,16136735	6	0,02689456				Ho
Total	0,64129789	7					

Con 150 mM de glucosa

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>	
Entre grupos	2,32353876	1	2,32353876	7,63835786	0,02453198	5,31765506	Se rechaza
Dentro de los grupos	2,43354794	8	0,30419349				Ho
Total	4,7570867	9					

200 Mm de glucosa

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>	
Entre grupos	0,01035842	1	0,01035842	0,08586084	0,78407933	7,70864742	Se
Dentro de los grupos	0,48256762	4	0,1206419				acepta
Total	0,49292603	5					Ho

De acuerdo al análisis de varianza se concluye que hay evidencia significativa para decir que la velocidad de transporte de glucosa entre la cepa recombinante y silvestre a concentraciones de 100 y 150 mM de glucosa son diferentes. Y también se observa que no hay diferencia significativa entre las cepas a concentraciones de glucosa de 200 mM.

6.7. Rendimiento

Tablas 6.3 Rendimiento de etanol en la cepa silvestre con y sin benzoato a las 8 y 24 horas.

rendimiento 8 h		
	wt	Wtb
mmol etoh producido	2,5	2,5
mmol de glucosa consumido	2,1	1,3
Rendimiento mmol _{etanol} /mmol _{glucosa}	1,2	1,8

rendimiento 24 h		
	wt	Wtb
mmol etoh producido	7,9	7,0
mmol de glucosa consumido	7,6	6,3
Rendimiento mmol _{etanol} /mmol _{glucosa}	1,0	1,1

Se observa en la tabla 6.3, que la cepa silvestre que se cultivó en medio con 2 mM de benzoato de sodio, presenta un rendimiento mayor que en la cepa cultivada sin benzoato, esto es debido a que en la cepa crecida en ausencia de benzoato de sodio una parte de la glucosa es utilizada para el crecimiento, mientras que en la que sí lo contenía la glucosa es utilizada para contener

contra la acidez del medio, es decir, esta es utilizada para la generación de ATP, lo cual implica producción de etanol, además que esta cepa casi no utilizó intermediarios glicolíticos para la producción de biomasa.

7. CONCLUSIONES

- Se logró obtener la construcción genética, es decir insertar el gen del transportador *HXT1* a un plásmido multicopia para levadura.
- Al realizar la secuenciación de la construcción genética, se observaron dos cambios en los aminoácidos, sin embargo al pertenecer al mismo grupo de aminoácidos y estar en los loops de la proteína se concluyó que la probabilidad de que afectaran la función del transportador es baja.
- Se logró la sobre-expresión del gen y la sobre-producción de la proteína del transportador.
- No hubo diferencia en la producción de etanol entre la cepa recombinante (pCHxt1) y la silvestre.
- Hubo un aumento en la velocidad específica de producción de etanol en las cepas que se cultivaron en un medio que contenía 2 mM de benzoato de sodio.
- La concentración de 25 mg de proteína, es la adecuada para la realización del ensayo de transporte.
- Según el análisis de varianza hay diferencia significativa en la velocidad de transporte entre la cepa recombinante y la cepa silvestre a concentraciones de 100 y 150 mM de glucosa.
- El transporte de glucosa no es una etapa limitante en la glicólisis, en las condiciones en las que se realizó la fermentación.
- La demanda de ATP generada por el benzoato de sodio, incrementa la velocidad de producción de etanol y el rendimiento de la vía.

8. BIBLIOGRAFÍA

- **Balat M, Balat H, Öz C.** Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2008; **34**(5):551–573.
- **Boles, E., and C. P. Hollenberg.** 1997. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**:85–111.
- **Christianson T., Sikorski R., Dante M., Shero J., Hieter P.** *Gene*, Volume 110, Issue 1, 2 January 1992, Pages 119-122
- **Daran-Lapujade P, Rossell S, van Gulik WM, Luttik MA, de Groot MJ, Slijper M, Heck AJ, Daran JM, de Winde JH, Westerhoff HV, Pronk JT, Bakker BM.** The fluxes through glycolytic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* are predominantly regulated at posttranscriptional levels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, **104** (40):15753-8.
- **Dickinson R., Schweizer M.** The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Taylor & Francis, 1999.
- **Diderich J., Teusink B., Valkier, Anjos J., Spencer-Martins I., Van Dam and Walsh M.** Strategies to determine the extent of control exerted by glucose transport on glycolytic flux in the yeast *Saccharomyces bayanus*. *Microbiology* (1999), 145, 3447–3454
- **Elbing K. , Larsson C., et al.** Role of Hexose Transport in Control of Glycolytic Flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied And Environmental Microbiology*, Sept. 2004, p. 5323–5330
- **Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G, Zacchi G.** Bio-ethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* 2006 Dec;24(12):549-56.

- **Hauf J., Zimmermann F., Müllera S.** Simultaneous genomic overexpression of seven glycolytic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 26 (9–10), Junio 2000, Paginas 688-698
- **Kasahara T., Ishiguro M. And Kasahara M.** Eight Amino Acid Residues in Transmembrane Segments of Yeast Glucose Transporter Hxt2 Are Required for High Affinity Transport. *The journal of biological chemistry* vol. 281, no. 27, pp. 18532–18538, julio 7, 2006
- **Koebmann BJ, Westerhoff HV, Snoep JL, Solem C, Pedersen MB, Nilsson D, Michelsen O, Jensen PR.** The extent to which ATP demand controls the glycolytic flux depends strongly on the organism and conditions for growth. *Mol Biol Rep.* 2002; **29**(1-2):41-5.
- **Larsson C, Pålman IL, Gustafsson L.** The importance of ATP as a regulator of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 2000, **16**(9):797-809.
- **Nelson D., Cox M.** Lehninger. Principios de Bioquímica. Ed. Omega, 4ta Edición.
- **O'Zcan S., Johnston M.** Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, Sept. 1999, P. 554–569
- **Reifenberger, E., E. Boles, and M. Ciriacy.** 1997. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* **245**:324–333.

- **Rossi G., Sauer M., Porro D., Branduardi P.** Effect of HXT1 and HXT7 hexose transporter overexpression on wild-type and lactic acid producing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Microbial Cell Factories* 2010, 9:15
- **Schaaff I, Heinisch J, Zimmermann FK.** Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. *Yeast*. 1989, 5(4):285-90.
- **Warth A.** Effect of Benzoic Acid on Glycolytic Metabolite Levels and Intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, Dic. 1991, p. 3415-3417 Vol. 57, No. 12
- http://www.sener.gob.mx/webSener/res/PE_y_DT/pub/Biocombustibles_en_Mexico_Estudio_Completo.pdf
- *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>)
- Oligo Calculator: Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)

9. ANEXO I

▪ MEDIOS DE CULTIVO

Medio LB para bacterias	1L
Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	10g
Agar	20g
Ampicilina stock(25 mg/mL)	1mL

Medio YPD para levaduras	1L
Extracto de levadura	10g
Peptona de caseína	20g
Dextrosa anhidrida	20g
Agar	20g

Medio mínimo para levaduras (HML)	1L
Stock de vitaminas*	1000µL
Stock de trazas**	1000µL
Stock de sales***	20mL
Glucosa	20g
Sulfato de amonio	5g
Agar	25g

* El medio es enriquecido con Histidina, Metionina y Leucina para propiciar el crecimiento de las levaduras.

Aminoácido	Concentración en el medio g/L
Histidina	0,02
Metionina	0,02
Leucina	0,1

* Stock de Vitaminas	(1000x)
Biotina	2mg
Pantotenato de calcio	400mg
Ácido fólico	2mg
Niacina	400mg

Ácido p-amino benzoico	200mg
Piridoxina	400mg
Riboflavina	200mg
Tiamina-HCl	400mg
Inositol	200mg
H ₂ O	1000mL
** Stock de Trazas	(1000x)
Ácido Bórico	500mg
Sulfato cúprico	40mg
Ioduro de potasio	100mg
Cloruro férrico	200mg
Sulfato de magnesio	400mg
Molibdato de sodio	200mg
Sulfato de zinc	400mg
H ₂ O	1000mL

***** Stock de Sales**

Fosfato monobásico de potasio	50g
Sulfato de magnesio	5g
Cloruro de sodio	1g
Cloruro de calcio	1g
H ₂ O	1000mL
Cloroformo	5mL