



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CONVERSIÓN DE XILOSA A ETANOL EN LEVADURAS TERMO-
TOLERANTES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

EMILIANO BALDERAS RAMÍREZ

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Luis Caspeta Guadarrama

Instituto de Biotecnología

Cuernavaca, Mor. Enero de 2022



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.

La investigación reportada en esta tesis se realizó en el Laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas y Biología Sintética de Microorganismos, del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, del Instituto de Biotecnología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, con la dirección del Dr. Luis Caspeta Guadarrama.

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT TA200119 y BV100119. Se contó con una beca para estudios de posgrado otorgada por CONACYT (925288).

AGRADECIMIENTOS

TUTOR:

Dr. Luis Caspeta Guadarrama

LIDER ACADÉMICO

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marcela Ayala Aceves (IBT/UNAM)

Dra. Alicia González Manjarrez (IFC/UNAM)

INTEGRANTES DEL JURADO

Dra. Luz de María Bretón Deval (IBT/UNAM)

Dr. José Utrilla Carreri (CCG/UNAM)

Dra. Katy Juárez Lopez (IBT/UNAM)

Dr. Alexander de Luna Fors (LANGEBIO/ CINVESTAV)

Dra. María Soledad Funes Argüello (IFC/UNAM)

INVESTIGADORES DEL LABORATORIO DE INGENIERÍA EN VIAS METABÓLICAS:

Dr. Francisco Bolívar Zapata

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Dr. José Adelfo Escalante Lozada

TÉCNICOS ACADÉMICOS:

Dra. Noemí Flores Mejía

Q. Luz María Martínez Mejía

M. C. Georgina Teresa Hernández Chávez

PERSONAL ADMINISTRATIVO DEL LABORATORIO DE INGENIERÍA EN VIAS METABÓLICAS:

Biol. Manuel Saucedo Ramírez

C.P. Rubí Margarita Robledo López

Aurelia González Guzmán

PERSONAL DE LA UNIDAD DE SÍNTESIS Y SECUENCIACIÓN DE ADN

Dr. Rubén Paul Gaytán Colín

Q. I. Santiago Becerra

M. C. Eugenio López Bustos

M. C. Jorge Arturo Yañez

AI PERSONAL DE LA UNIDAD DE CÓMPUTO

M.C. Arturo Ocádiz

MEM David Santiago Castañeda

Ing. Roberto Pablo Rodríguez

AI PERSONAL DE LA UNIDAD DE DOCENCIA Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

Ing. Jalil Saab (QPD)

Lic. J. Antonio Bolaños Guillén

Gloria Villa Herrera

Dedicatorias

Para mis padres y para Arlen.

Agradecimientos especiales

Al Dr. Luis Caspeta Guadarrama, al Dr. Alfredo Martínez Jiménez, a la Dra. Alicia González Manjarrez y a la Dra. Marcela Ayala Aceves: por haberme guiado en el transcurso de mi maestría y contribuido enormemente en mi formación profesional y personal.

A Caheri Salas y a León Arenas: por su colaboración en el diseño y realización de experimentos cruciales para esta tesis.

A Daniel, Elsa, Ricardo y María: por su invaluable amistad.

Al Dr. Alejandro C. Ramírez Reivich, a la Dra. María del Pilar Corona Lira y a Rosario Corona Lira: por todo su apoyo, que fue crucial en la etapa final de la realización de esta tesis.

RESUMEN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo más utilizado en las fermentaciones para la producción de etanol carburante. El consumo de xilosa aunado a la sacarificación y fermentación simultaneas (SFS) es preponderante para generar procesos de producción de etanol con factibilidad económica y energética adecuadas. Sin embargo, la factibilidad técnica de esta estrategia se limita debido a que esta levadura no consume la xilosa de manera natural y su metabolismo está limitado a temperaturas menores a 37 °C y una temperatura de 40 °C resulta letal, pero la SFS se realiza a temperaturas mayores de 40 °C. Dado lo anterior, en este trabajo se buscó generar cepas de *S. cerevisiae* capaces de metabolizar xilosa por la vía de isomerización, expresando heterológamente el gen *XYLA* de *Piromyces* *sp. E2* y producir etanol a temperaturas de 40 °C o superiores mediante la delección del gen *ERG3*. Si bien la expresión heteróloga de *XYLA* permitió a la levadura consumir xilosa y la eliminación de *ERG3* confirió termotolerancia, la combinación de ambas modificaciones limitó drásticamente el consumo de xilosa a la temperatura óptima de crecimiento (30 °C) o a elevada temperatura (37 °C y 39 °C). Los resultados obtenidos con las cepas silvestre y mutante en *ERG3* transformadas con el plásmido que expresa *XYLA*, cultivadas a 30 °C, 37 °C y 39 °C sugieren que el metabolismo de la xilosa se lleva a cabo por la vía respiratoria y se limita por la fermentativa. Como consecuencia de tener un metabolismo que utiliza mayormente la vía fermentativa, el desempeño de la mutante *ERG3* se vio reducido en medios con xilosa como fuente de carbono. De hecho, estas mutantes, en la mejor condición, consumen cuatro veces menos xilosa que la cepa silvestre, ambas expresando *XYLA*. Es de destacar que la cepa silvestre consume el doble de la xilosa a 37 °C que, a 30 °C, en el mismo periodo de tiempo. La posibilidad de que la xilosa se consuma preferentemente por el metabolismo aerobio requiere otras modificaciones para generar termotolerancia, así como estrategias de redireccionamiento de su metabolismo hacia la vía fermentativa.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	6
INDICE GENERAL	7
INDICE DE TABLAS	10
INDICE DE FIGURAS	12
1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. ANTECEDENTES.....	17
2.1 <i>Bioetanol</i>	17
2.2 <i>Biomasa lignocelulósica</i>	19
2.3 <i>Pretratamiento y sacarificación de la biomasa vegetal para obtener la glucosa y xilosa</i>	21
2.4 <i>Fermentación de la glucosa</i>	24
2.5 <i>Fermentación de la xilosa</i>	27
2.6 <i>Sacarificación y fermentación simultánea</i>	29
2.7 <i>Saccharomyces cerevisiae: su potencial uso en sacarificación y fermentación simultánea de glucosa y xilosa</i>	30
2.7.1 <i>Consumo de xilosa en levaduras modificadas por ingeniería metabólica.</i>	31
2.7.2 <i>Levaduras termotolerantes generadas por ingeniería metabólica inversa</i> 33	
3. JUSTIFICACIÓN.....	34
4. OBJETIVO GENERAL.....	35
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
6. HIPÓTESIS.....	35
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
7.1 <i>Cepas, plásmidos y oligonucleótidos.</i>	35
7.2 <i>Medios de cultivo</i>	37
7.2.1 <i>Medio DELFT</i>	37
7.2.2 <i>Medio YNB</i>	38
7.2.3 <i>Medio YPD</i>	38

7.2.4	Medio LB	39
7.3	<i>Métodos de cultivo, muestreo y preparación de las muestras</i>	39
7.4	<i>Métodos analíticos</i>	40
7.4.1	Cuantificación de biomasa.....	40
7.4.2	Cuantificación de glucosa, xilosa y metabolitos de fermentación.	40
7.4.3	Cuantificación de DNA.....	40
7.5	<i>Métodos para la manipulación del DNA</i>	41
7.5.1	Eliminación del gen <i>ERG3</i> para obtener la cepa termo-tolerante WSCB02.....	41
7.5.2	Diseño del marco de lectura e integración del gen <i>XYLA</i> al genoma de <i>S. cerevisiae</i>	46
7.5.3	Clonación de la unidad transcripcional <i>XYLA</i> en el vector pJET1.2/Blunt	47
7.5.4	Construcción del vector pSCBXYLA.....	50
7.5.5	Generación de cepa termotolerante capaz de consumir xilosa.	56
7.6	<i>Evaluación fisiológica de las cepas generadas</i>	58
7.6.1	Evaluación del crecimiento utilizando xilosa como fuente de carbono. 58	
7.6.2	Determinación de parámetros cinéticos del crecimiento en xilosa	59
7.7	<i>Evolución dirigida para mejorar el consumo de xilosa de cepas generadas</i> . 61	
8.	RESULTADOS y DISCUSIÓN	62
8.1	<i>Generación de la cepa termotolerante por sustitución del gene <i>ERG3</i> por la secuencia <i>loxP-KanMX-loxP</i> en la cepa W3031A</i>	62
8.2	<i>Diseño, construcción y clonación del gen de la xilosa isomerasa <i>XYLA</i> en <i>S. cerevisiae</i></i>	64
8.2.1	Obtención y armonización de <i>XYLA</i> para <i>S. cerevisiae</i>	64
8.2.2	Construcción del vector pJET-XYLA para su clonación en <i>E. coli</i>	65
8.2.3	Construcción del vector pSCBXYLA para su clonación en <i>S. cerevisiae</i>	68
8.2.4	Comprobación de la arquitectura molecular del vector pSCBXYLA. .	70
8.2.5	Transformación de la cepa WSCB02 con el vector pSCBXYLA.....	72

8.3	<i>Evaluación del crecimiento de WSCB02[pSCBXYLA] y W3031A [pSCBXYLA] con xilosa a 30 °C.....</i>	74
8.4	<i>Evolución dirigida de cepas WSCB02[pSCBXYLA] y W3031A [pSCBXYLA].</i>	77
8.4.1	<i>Cinéticas de cultivo de las cepas WSCB02 [pSCBXYLA] y W3031A [pSCBXYLA] en xilosa a 30 °C, 37 °C y 39 °C.....</i>	79
9.	CONCLUSIONES	87
10.	PERSPECTIVAS	87
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	89
12.	MATERIAL ADICIONAL.....	96
12.1	<i>Apéndice A.....</i>	96
12.2	<i>Apéndice B.....</i>	97
12.3	<i>Apéndice C.....</i>	98
12.4	<i>Apéndice D.....</i>	99
12.5	<i>Apéndice E.....</i>	100
12.6	<i>Apéndice F.....</i>	101

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Producción mundial de bioetanol, en miles de millones de litros, de 2015 a 2019 (Renewable Fuels Association, 2020).....	18
Tabla 2: Composición de algunos tipos de biomasa lignocelulósica.....	21
Tabla 3: Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	36
Tabla 4: Volumen de componentes soluciones para la reacción de PCR para usada para amplificar el marcador KanMX a partir de plásmido pUG6, volumen total 250 μ L.....	43
Tabla 5: Programa de PCR utilizado para amplificar el marcador KanMX a partir de plásmido pUG6. Se realizaron 35 ciclos del paso 2 al 4.....	44
Tabla 6: Mezcla de soluciones usada en la transformación por el método de acetato de litio.....	44
Tabla 7: Volumen de componentes de la reacción de PCR para comprobar la sustitución del gen <i>ERG3</i> a partir de gDNA.....	45
Tabla 8: Programa de PCR utilizado para comprobar sustitución de <i>ERG3</i> a partir de gDNA.....	45
Tabla 9: Condiciones de reacción de la digestión enzimática del vector pJETXYLA, volumen total 20 μ L. La reacción se incubó a 37°C por 60 minutos.....	59
Tabla 10: Volumen de componentes de la reacción de PCR para amplificar el vector pSAL4 con los oligos 5 y 6 o la unidad transcripcional <i>XYLA</i> a partir de pJETXYLA con los oligos 7 y 8.....	52
Tabla 11: Programa de PCR utilizado para amplificar el vector pSAL4 o la unidad transcripcional <i>XYLA</i>	52
Tabla 12: Componentes de reacción para la digestión enzimática de productos de PCR, volumen total 20 μ L. La reacción se incubó a 37 °C por 60 minutos y se inactivó a 80 °C por 20 minutos.....	52

Tabla 13: Mezcla de transformación para el método de acetato de litio.....	53
Tabla 14: Componentes de reacción para la digestión enzimática de pSCBXYLA y pSAL4 extraído de <i>E. coli</i> . Volumen total: 20 µL. La reacción se incubó a 37 °C por 60 minutos y se inactivó a 80 °C por 20 minutos.....	55
Tabla 15: Mezcla de transformación para el método de acetato de litio.....	57
Tabla 16: Medios utilizados para evaluar el crecimiento de las cepas generadas en el proyecto utilizando xilosa como fuente única de carbono única.....	59

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama esquemático de la estructura y contenido polimérico de la biomasa lignocelulósica.....	20
Figura 2: Hidrólisis de la celulosa e inhibición en el sistema enzimático utilizado. CBH: celobiohidrolasas, EG: endoglucanasas, β G: b-glucosidasas (Andrić et al., 2010).....	22
Figura 3: Hidrólisis del xilano e inhibición en el sistema enzimático utilizado. AXE: acetil xilan-esterasa, GU: α -glucouronosidasa, AF: α -arabinofuranosidasa, EX: β -1,4-endoxilanasas, β X: β -xilosidasa (Reilly, 1981).....	23
Figura 4: El papel básico de la glucosa en el metabolismo celular.....	25
Figura 5: Metabolismo oxidativo de la glucosa. En azul se muestra la glucólisis y en rosa la vía de pentosas fosfato. S7P: sedoheptulosa-7-fosfato, E4P: eritrosa-4-fosfato, F6P: fructuosa-6-fosfato, G6P: glucosa-6-fosfato.....	26
Figura 6: Rol del piruvato en procesos de respiración celular (A) y fermentación (B).....	27
Figura 7: Vías de consumo de xilosa. Vía de Isomerización utilizando la xilosa isomerasa (XI), y vía de oxido-reducción utilizando la xilosa reductasa (XR) y xilitol deshidrogenasa (XDH).....	28
Figura 8: Proceso de sacarificación y fermentación: A) separada (SF), B) simultanea (SFS)	30
Figura 9: Vías heterólogas de consumo de xilosa en <i>S. cerevisiae</i> y balance estequiométrico en cada una. A la izquierda: vía oxido-reductiva en la que se utiliza NADPH como cofactor para reducir xilosa a xilitol. A la derecha: vía de isomerización (equivalente a la vía oxido-reductiva utilizando NADH como cofactor de XR).....	32
Figura 10: Estrategia para la sustitución del gen <i>ERG3</i> por la secuencia <i>loxP-KanMX-LoxP</i>	42

Figura 11: Mapa del vector pUG6, el cual contiene el marcador de selección flanqueado por sitios loxP utilizado para sustituir al gen <i>ERG3</i>	43
Figura 12: Estrategia para ensamblar <i>in silico</i> la unidad transcripcional <i>XYLA</i> compuesta por el promotor <i>TEF1</i> , la secuencia armonizada del marco de lectura del gen <i>XYLA</i> , el terminador <i>CYC1</i> y sitios de corte de <i>XhoI</i> en los extremos.....	47
Figura 13: Estrategia para obtención de vector pJETXYLA: clonación de unidad transcripcional <i>XYLA</i> sintetizada por IDT en vector pJET1.2/Blunt y posterior selección en medio rico con Carbenicilina.....	48
Figura 14: Mapa del vector pJETXYLA resultado de la clonación de la unidad transcripcional <i>XYLA</i> en el sitio múltiple de clonación del vector pJET1.2/Blunt.....	49
Figura 15: Estrategia para ensamblar el vector pSCBXYLA que confiera a la cepa W3031A la capacidad de consumir xilosa por la vía de isomerización y restaure la auxotrofia a uracilo.....	50
Figura 16: Mapa del vector pSAL4 con origen de replicación para levaduras y bacterias. Completa la auxotrofia a uracilo en levaduras <i>URA3-</i> y confiere resistencia a Ampicilina en bacterias.....	51
Figura 17: Plásmido pSCBXYLA generado por recombinación homóloga de pSAL4 y la unidad transcripcional <i>XYLA</i> . Puede replicarse en <i>E. coli</i> y en levaduras. Restaura auxotrofia a uracilo en cepas de <i>S. cerevisiae</i> <i>URA3-</i> y confiere capacidad de consumir xilosa por la vía de isomerización.....	54
Figura 18: Estrategia para replicar pSCBXYLA en <i>Escherichia coli</i> , necesario para confirmación molecular del plásmido.....	55
Figura 19: Estrategia para generar cepa termo-tolerante con la capacidad de consumir xilosa.....	57
Figura 20: Estrategia diseñada para evaluar la capacidad de la cepa WSCB02 [pSCBXYLA] y W3031A [pSCBXYLA] de consumir xilosa como única fuente de carbono.....	58

Figura 21: Estrategia para evaluar los parámetros cinéticos de las cepas generadas en el proyecto.....	60
Figura 22: Estrategia de evolución dirigida enfocada en utilizar glucosa en concentraciones bajas en las primeras etapas del proceso y reducirla en dos etapas hasta llegar a solo tener xilosa como fuente de carbono.....	61
Figura 23: A) Diagrama que muestra la región en que los oligos 3 y 4 alinean. B) Productos de PCR de reacción para confirmar sustitución de <i>ERG3</i> . C) Patrón de bandas del marcador de peso molecular <i>GeneRuler</i> 1kb de la marca <i>Thermo Scientific</i> utilizado en todos los experimentos de este proyecto. D) Crecimiento de cepas transformadas en medio con antibiótico.....	63
Figura 24: Resultado de BLASTn (A) y BLASTx (B) de la secuencia armonizada de <i>XYLA</i> en la base de datos de NCBI.....	66
Figura 25: Comprobación de la arquitectura molecular del vector pJETXYLA (1µg) por digestión enzimática con <i>XhoI</i> . A) Gel de agarosa que muestra resultado de digestión. B) Diagrama del vector pJETXYLA resultante.....	67
Figura 26: Selección de candidatas W3031A [pSCBXYLA] en medio YNBX ₂₀ , incubación a 30 °C durante 6 días. A) Células que crecieron después de la transformación con los fragmentos lineales pSAL4 y <i>XYLA</i> . B) Selección de 40 candidatas de la transformación, segundo pase realizado para descartar falsos positivos. C) Selección de 6 candidatas del segundo pase, tercer pase realizado para descartar falsos positivos.....	69
Figura 27: Cepa W3031A [pSAL4] en medio mínimo. A) Medio YNBX ₅₀ , control que comprueba que pSAL4 no confiere capacidad de consumir xilosa. B) Medio YNBG ₂₀ , control de transformación.....	70
Figura 28: Comprobación de la arquitectura molecular del vector pSCBXYLA (1 µg) por digestión enzimática con <i>HindIII</i> . A) Gel de agarosa que muestra resultado de digestión. B) Diagrama del vector pSCBXYLA resultante.....	71

Figura 29: Transformación de cepa WSCB02 con pSCBXYLA y comprobación de la sustitución <i>ERG3::loxP-XYLA-loxP</i> . A) Colonias resultantes de la transformación. B) Primer pase de cuatro candidatas. C) Segundo pase de candidata 1. D) Gel de agarosa que muestra resultado de PCR con gDNA de la cepa WSCB02[pSCBXYLA] en carril 4 y del control W3031A[pSCBXYLA] en carril 3	73
Figura 30: Evolución de cepas W3031A [pSCBXYLA] y WSCB02 [pSCBXYLA] en medio con xilosa y glucosa.....	78
Figura 31: Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y xilosa, y producción de etanol de la cepa silvestre W3031A transformada con el plásmido pSCBXYLA, cultivada a 30 °C y 250 rpm durante 96 horas en medio YNBX ₂₀ G ₂	81
Figura 32: Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y xilosa, y producción de etanol de la cepa silvestre WSCB02 transformada con el plásmido pSCBXYLA, cultivada a 30 °C y 250 rpm durante 96 horas en medio YNBX ₂₀ G ₂	82
Figura 33: Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y xilosa, y producción de etanol de la cepa silvestre W3031A transformada con el plásmido pSCBXYLA, cultivada a 37 °C y 250 rpm durante 96 horas en medio YNBX ₂₀ G ₂	83
Figura 34: Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y xilosa, y producción de etanol de la cepa silvestre WSCB02 transformada con el plásmido pSCBXYLA, cultivada a 37 °C y 250 rpm durante 96 horas en medio YNBX ₂₀ G ₂	84
Figura 35: Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y xilosa, y producción de etanol de la cepa silvestre W3031A transformada con el plásmido pSCBXYLA, cultivada a 39 °C y 250 rpm durante 96 horas en medio YNBX ₂₀ G ₂	85
Figura 36: Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y xilosa, y producción de etanol de la cepa silvestre WSCB02 transformada con el plásmido pSCBXYLA, cultivada a 39 °C y 250 rpm durante 96 horas en medio YNBX ₂₀ G ₂	85
Figura 37: Rendimiento de biomasa por xilosa consumida en las 5 réplicas del cultivo de la cepa WT/XYLA a 30, 37 y 39°C.....	86

1. INTRODUCCIÓN

El bioetanol tiene aplicaciones muy importantes como combustible y precursor químico, puede obtenerse de fuentes renovables y su huella de CO₂ es menor que la de los combustibles fósiles. Este alcohol se puede producir por fermentación de la glucosa y xilosa contenidas en la biomasa lignocelulósica, la cual es abundante y no es utilizada como fuente primaria de alimento. *Saccharomyces cerevisiae* fermenta la glucosa a etanol muy eficientemente a temperaturas entre 30 °C y 35 °C. Sin embargo, esta levadura no puede fermentar la xilosa de forma nativa y su metabolismo es muy ineficiente a temperaturas mayores de 35 °C. Por otro lado, conferir a *S. cerevisiae* la capacidad de consumir xilosa aumentaría el rendimiento y el título de etanol y soportar temperaturas mayores a 40 °C permitirían la obtención y fermentación de glucosa y xilosa en una sola operación unitaria conocida como sacarificación y fermentación simultánea (SFS). De manera que ambas funciones son indispensables para diseñar procesos económicamente viables para la producción comercial de etanol. Mediante ingeniería metabólica se han logrado generar cepas de levadura que, de forma independiente, fermentan xilosa o toleran temperaturas iguales o superiores a 40 °C (Caspeta et al., 2014, 2016; Kuyper et al., 2004; Zhou et al., 2012). En las investigaciones citadas no se identifica la posibilidad de generar una cepa con ambas capacidades, tampoco se estudia el efecto de la temperatura en el metabolismo de la xilosa. Por lo tanto, en este trabajo se utilizó ingeniería metabólica para generar cepas termo tolerantes de *S. cerevisiae* capaces de metabolizar xilosa a temperaturas mayores a 35 °C. Las funciones metabólicas de estas cepas se evaluaron en cultivos con xilosa y glucosa, a temperaturas de 30, 37 y 39 °C.

2. ANTECEDENTES

2.1 Bioetanol

La creciente preocupación por el medio ambiente, el aumento constante en la demanda energética y la incertidumbre por la disponibilidad de los combustibles fósiles en el futuro ha llevado a muchos países a buscar alternativas para obtener energía limpia, principalmente para suplir la demanda del sector de transporte, que produce más del 70% de las emisiones globales de monóxido de carbono (CO) y 19% de dióxido de carbono (CO₂) (Caspeta et al., 2013). La respuesta de la bioingeniería es la producción de combustibles obtenidos a partir de biomasa vegetal (biocombustibles). Entre sus principales ventajas destacan que pueden obtenerse a partir de materia prima renovable, su obtención tiene un bajo impacto en el medio ambiente, pueden contribuir a reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, representan una potencial fuente de ingresos para países en desarrollo y una alternativa a la dependencia de importaciones de petróleo para otros.

El biocombustible más utilizado actualmente es el bioetanol, etanol (C₂H₅OH) obtenido a partir de la fermentación de los carbohidratos presentes en granos, tubérculos y caña de azúcar. Este, puede emplearse directamente como en los motores de combustión interna de gasolina o utilizarse en mezclas de 10% etanol y 90% gasolina (E10) u 85% etanol y 15% gasolina (E85) (Canada, 2016; Fontaras et al., 2017).

A pesar de tener 68% menos contenido energético comparado con el petróleo, ser corrosivo para algunos motores y ser miscible en agua; el uso de bioetanol resulta en menores emisiones de CO₂ por kWh producido: pasando de los 2.3 kg de CO₂ por kWh de la gasolina a 2.1 para la mezcla E10 y 2.3 para la mezcla E85 (Canada, 2016; Fontaras et al., 2017). Comparado con el uso de combustibles fósiles y mediante un balance energético general se ha determinado que la relación entre el contenido energético del bioetanol y la energía consumida en todo el

proceso de producción de este compuesto es 20 % a 30 % mayor para el bioetanol que para la gasolina (Caspeta et al., 2013).

Entre 2007 y 2019, su producción anual pasó de 49.7 mil millones a 109.7 mil millones de litros y se prevé que para 2022 aumente a 168 mil millones de litros (U.S. Department of Energy, 2020). Actualmente, Estados Unidos es el mayor productor con el 54% de la producción global, seguido por Brasil con el 30% (Renewable Fuels Association, 2020) (**Tabla 1**), ambos con un costo de producción cercano a 0.5 dólares por litro (Soccol et al., 2019).

Tabla 1: Producción mundial de bioetanol, en miles de millones de litros, de 2015 a 2019 (Renewable Fuels Association, 2020).

Región	2015	2016	2017	2018	2019	% producción mundial
Estados Unidos	56,051	58,345	60,324	60,911	59,726	54%
Brasil	27,255	25,552	25,173	30,245	32,517	30%
Unión Europea	5,148	5,148	5,375	5,489	5,186	5%
China	2,915	2,536	3,028	2,915	3,785	3%
Canadá	1,703	1,741	1,741	1,741	1,968	2%
India	719	1,060	757	1,628	1,931	2%
Tailandia	1,173	1,287	1,476	1,476	1,628	1%
Argentina	833	908	1,098	1,098	1,060	1%
Resto del mundo	1,488	1,843	1,719	2,002	1,976	2%
Total	97,285	98,421	100,692	107,506	109,777	

Más del 95% de este compuesto es producido a partir de maíz o caña de azúcar y utilizado, de alguna manera como combustible para automóviles, camiones ligeros y algunos aviones (Soccol et al., 2019). Sin embargo, la producción de biocombustibles a partir de materias primas que pueden ser utilizadas como alimento, no sólo supone un dilema ético, sino que aumenta los costos generales del proceso.

2.2 Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica se refiere a cualquier materia vegetal e incluye varios residuos agroindustriales como rastrojo de maíz, rastrojo de trigo, paja, bagazos, pastos y algas, entre otros (Kumar et al., 2009). Se considera como el recurso renovable más abundante y en las últimas dos décadas ha cobrado especial importancia por representar una alternativa potencial para la producción de biocombustibles y suplantar el uso de maíz y caña de azúcar como materia prima (Nanda et al., 2015).

La biomasa lignocelulósica está conformada por tres polímeros (Cai et al., 2017) (**Fig. 1**):

1) Celulosa: ésta está formada de monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos $\beta(1\rightarrow4)$ y empaquetados en fibras en su mayoría independientes y unidas débilmente entre sí por puentes de hidrógeno (Hendriks, 2009).

2) Hemicelulosa: ésta no es un polímero homogéneo como la celulosa, está formada por varios polímeros a su vez compuestos de pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, galactosa) y azúcares ácidos (Hendriks & Zeeman, 2009). Tiene un peso molecular menor al de la celulosa y ramificaciones con cadenas laterales cortas fácilmente hidrolizables. Funciona como una conexión entre la lignina y las fibras de celulosa y juega un papel importante en la integridad y rigidez de la estructura de la biomasa lignocelulósica (Hendriks & Zeeman, 2009). El componente mayoritario de la hemicelulosa es el xilano y su estructura principal es una cadena de residuos de xilosa unidos por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$, ramificada con grupos acetil en la posición O-3, cada 2 residuos de xilosa en las maderas duras y cada 9 o 12 en maderas blandas; residuos 4-O-metil- α -D-ácido glucurónico unidos con enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$ en una proporción 1 a 4 con respecto a la xilosa y un residuo por cada 12 de xilosa de L-arabinofuranosa unido con enlaces $\alpha(1\rightarrow3)$ (Bastawde, 1992).

La solubilización de la hemicelulosa en agua a condiciones neutrales inicia alrededor de los 180 °C (Bobleter, 1994), sin embargo, bajo condiciones ácidas o alcalinas los polímeros el xilano pueden solubilizarse fácilmente (Hendriks & Zeeman, 2009; Koddenberg, 2016). La hidrólisis de la hemicelulosa se detalla en los siguientes capítulos.

3) Lignina: ésta es un heteropolímero complejo y uno de los más abundantes en la naturaleza después de la celulosa y hemicelulosa, principalmente se encuentra en plantas dando soporte estructural (Hendriks & Zeeman, 2009). Es resultado de la unión de algunos ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico) con distintos tipos de enlaces (Grabber, 2005). En la biomasa lignocelulósica funciona como barrera protectora de las células vegetales contra la degradación por hongos y bacterias. Su solubilización en agua en condiciones neutras inicia cerca a los 180 °C, mientras que en ácidos o bases depende de su composición (Grabber, 2005).

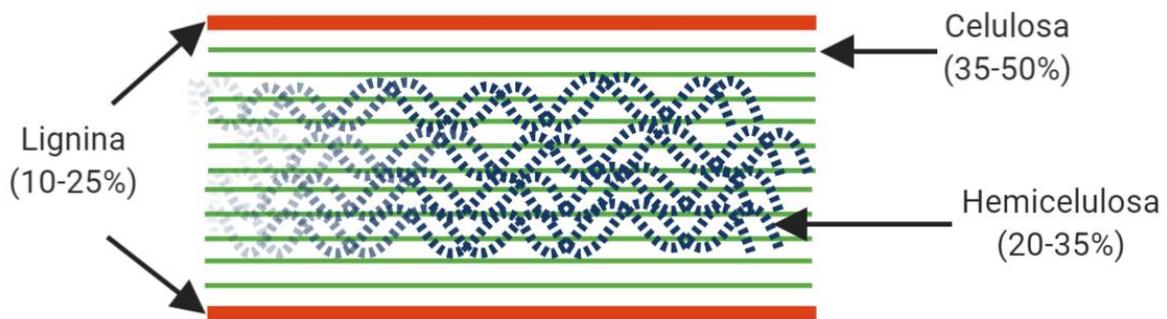


Figura 1: Diagrama esquemático de la estructura y el contenido de la biomasa lignocelulósica; compuesta mayormente por lignina, hemicelulosa y celulosa en los porcentajes mostrados en el diagrama.

La composición de la biomasa lignocelulósica varía según el material del que proviene (**Tabla 2**), La celulosa suele ser el componente mayoritario (35 – 50 %),

seguido por la hemicelulosa (20 y 35 %) y la lignina es el menos abundante (10-25 %) (Saha, 2003).

Este recurso es atractivo no solo por su abundancia, sino porque puede renovarse a un ritmo de 5.5×10^{16} g de carbón por año - aproximadamente 12 veces más que el carbón de petróleo que se utiliza anualmente; no se utiliza como alimento y el costo de obtención suele ser bajo ya que se puede obtener como un desecho agroindustrial (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Soccol et al., 2019). Sin embargo, se considera no fermentable pues la mayoría de los microorganismos no pueden degradarla sin un pretratamiento que libere los azúcares contenidos en la celulosa y hemicelulosa.

Tabla 2: Composición de algunos tipos de biomasa lignocelulósica.

	Composición (% de peso seco)		
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Fibra de maíz	15	35	8
Mazorca de maíz	45	35	15
Rastrojo de maíz	40	25	17
Paja de arroz	35	25	12
Paja de trigo	30	50	20
Bagazo de caña de azúcar	40	24	25

2.3 Pretratamiento y sacarificación de la biomasa vegetal para obtener la glucosa y xilosa

Para poder aprovechar los azúcares fermentables presentes en la biomasa, primero es necesario reducir su tamaño y romper los polímeros complejos que la componen para exponer sus azúcares simples (monómeros) (Kumar et al., 2009). Este proceso es llamado pretratamiento y comienza con una ruptura mecánica de la estructura física de la biomasa buscando reducir su tamaño (**Fig. 1**). Se realiza mayormente mediante fresado, triturado o astillado y en esta etapa se consume una cantidad elevada de energía por lo que debe optimizarse para alcanzar una relación

entre tamaño de partícula y energía consumida que permita hacer el proceso económicamente factible (Cadoche & López, 1989). Posteriormente, las partículas de biomasa se someten a un tratamiento fisicoquímico que busca separar la hemicelulosa, celulosa y lignina, romper la estructura de estos polímeros, reducir la cristalinidad de la celulosa y promover la liberación de los azúcares fermentables

Mediante una hidrólisis enzimática a temperaturas mayores de 40°C, la celulosa y hemicelulosa liberadas en el pretratamiento son convertidas en azúcares fermentables que pueden ser asimilados fácilmente por levaduras y bacterias, a esto se le conoce como *sacarificación*. Este proceso es complejo y requiere de varias reacciones secuenciales catalizadas por un sistema de enzimas mayormente obtenidas de hongos como *Trichoderma reesei* y varias especies de *Aspergillus* (Mäkelä et al., 2014). El costo económico de utilizar estos *cocteles* enzimáticos es elevado y constituye el mayor cuello de botella en la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, ya que representa del 40 % a 50 % del costo de los azúcares obtenidos.

La conversión de la fracción de celulosa a glucosa comienza con la degradación simultánea por endoglucanasas (EC 3.2.1.4), que rompen los enlaces internos $\beta(1\rightarrow4)$, y celobiohidrolasas (EC 3.2.1.176), que atacan los extremos reductores de la celulosa; la celobiosa resultante se hidroliza en glucosa por acción de las β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) (**Fig. 2**) (Andrić et al., 2010).

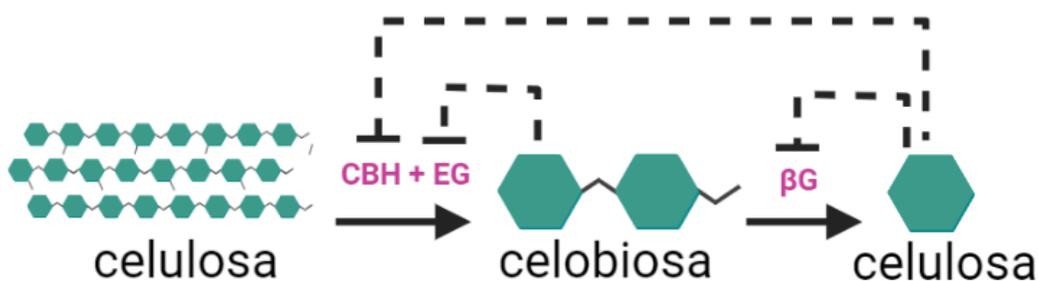


Figura 2: Hidrólisis de la celulosa e inhibición en el sistema enzimático utilizado. CBH: celobiohidrolasas, EG: endoglucanasas, β G: b-glucosidasas (Andrić et al., 2010).

La hidrólisis de la fracción de hemicelulosa no hidrolizada en el pretratamiento es más compleja y necesita diversas enzimas para convertir el xilano en xilosa: la β -1,4-endoxilanasas (EC 3.2.1.8) para hidrolizar los enlaces internos $\beta(1\rightarrow4)$; la β -xilosidasa (EC 3.2.1.37) para liberar xilosa a partir de xilobiosa y de cadenas cortas de xiloligosacáridos; y otras enzimas auxiliares como la α -arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) para liberar los residuos de arabinofuranosa, la α -glucouronosidasa (EC 3.2.1.139) para hidrolizar los residuos de ácido glucurónico y la acetil xilan-esterasa (EC 3.1.72) para hidrolizar enlaces éster en acetil-xilanos (**Fig. 3**) (Dutra et al., 2017; Reilly, 1981).

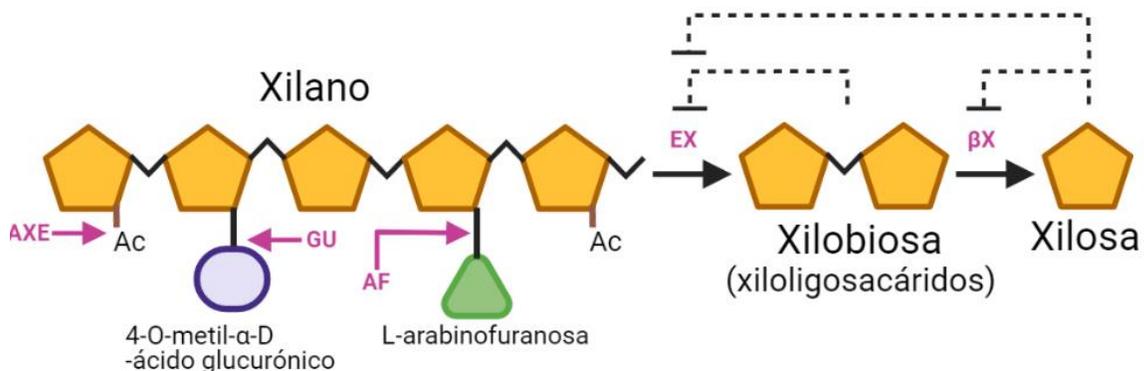


Figura 3: Hidrólisis del xilano e inhibición en el sistema enzimático utilizado. AXE: acetil xilan-esterasa, GU: α -glucouronosidasa, AF: α -arabinofuranosidasa, EX: β -1,4-endoxilanasas, β X: β -xilosidasa (Reilly, 1981).

Desafortunadamente, los sistemas enzimáticos que se utilizan actualmente para la sacarificación de la biomasa lignocelulósica son inhibidos por los productos de la misma hidrólisis: la celobiohidrolasa y la endoglucanasa son inhibidas por la celobiosa, y la glucosa inhibe la β -glucosidasa (Dekker, 1986; Gruno et al., 2004) (**Fig. 2**), mientras que la xilobiosa inhibe la actividad de la β -1,4-endoxilanasas y la xilosa inhibe tanto la β -xilosidasa como la endoxilanasas (Reilly, 1981) (**Fig. 3**). Este fenómeno se convierte en un problema mayor durante la sacarificación, que

mayormente es realizada en lote, puesto que la concentración de sustrato que en principio es elevada (y que debería favorecer la conversión a monómeros), irá disminuyendo mientras la concentración de los productos inhibidores, los cuales reducen la velocidad de conversión, aumentará (Andrić et al., 2010; Reilly, 1981). Se ha buscado mitigar el efecto de la inhibición de la hidrólisis con estrategias como el uso de altas concentraciones de enzimas, suplementación de β -glucosidasas durante la hidrólisis, reducción de la concentración de glucosa por ultrafiltración y acoplando el proceso de sacarificación con la fermentación en un proceso conocido como *sacarificación y fermentación simultánea* (SFS) (Panedy et al., 2011). El problema para llevar a cabo este proceso es la diferencia entre la temperatura de sacarificación y la de fermentación. Mientras que las enzimas operan bien a temperaturas superiores a 40°C, los microorganismos fermentadores no son eficientes a temperaturas mayores a 40°C.

2.4 Fermentación de la glucosa

La glucosa es el monosacárido más abundante en el mundo y el que mayor proporción tiene en la biomasa lignocelulósica. Es una hexosa con fórmula $C_6H_{12}O_6$ y ocupa un lugar central en el metabolismo de la mayoría de los seres vivos (Lehninger et al., 2005).

Por su elevado contenido energético, es un excelente combustible (su oxidación completa a CO_2 y agua produce un cambio en la energía libre de -2,840 kJ/mol), las células pueden almacenar grandes cantidades de este azúcar en forma de almidón o glucógeno sin afectar demasiado la osmolaridad citosólica, además de ser un importante precursor de vías biosintéticas de coenzimas, ácidos grasos, nucleótidos, aminoácidos, entre otros (Lehninger et al., 2005) (**Fig. 4**).

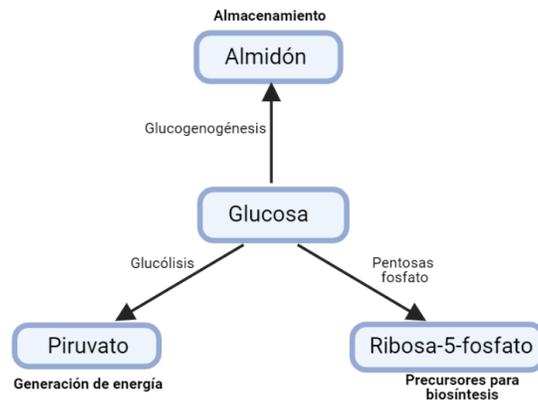


Figura 4: El papel básico de la glucosa en el metabolismo celular.

En el metabolismo energético, la glucosa puede ser oxidada a través de dos vías principales. La primera alternativa es la glucólisis, en donde se producirá energía en forma de ATP y NADH y la glucosa será transformada en dos moléculas de piruvato ($C_3H_4O_3$), el cual contiene la mayor parte de la energía de la glucosa (Lehninger et al., 2005) (**Fig. 5, A**). La segunda opción es que sea metabolizada en la vía de pentosas fosfato (PPP, por sus siglas en inglés) para obtener ribosa-5-fosfato y NADPH, que serán usados en los procesos metabólicos de biosíntesis (**Fig. 5, B**).

Según el tipo de célula y las condiciones ambientales en las que se encuentre, el piruvato puede tomar distintos caminos metabólicos. El piruvato es oxidado hasta CO_2 y agua en presencia de O_2 al ser procesado por el complejo piruvato-deshidrogenasa (PDH), el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA, por sus siglas en inglés) y posteriormente por la cadena transportadora de electrones (Stanbury et al., 2017). Es en esta vía en la que se puede obtener mayor energía por mol de glucosa y se utiliza el oxígeno como aceptor final de electrones, por lo que se conoce como *respiración celular* (Lehninger et al., 2005) (**Fig. 6, A**).

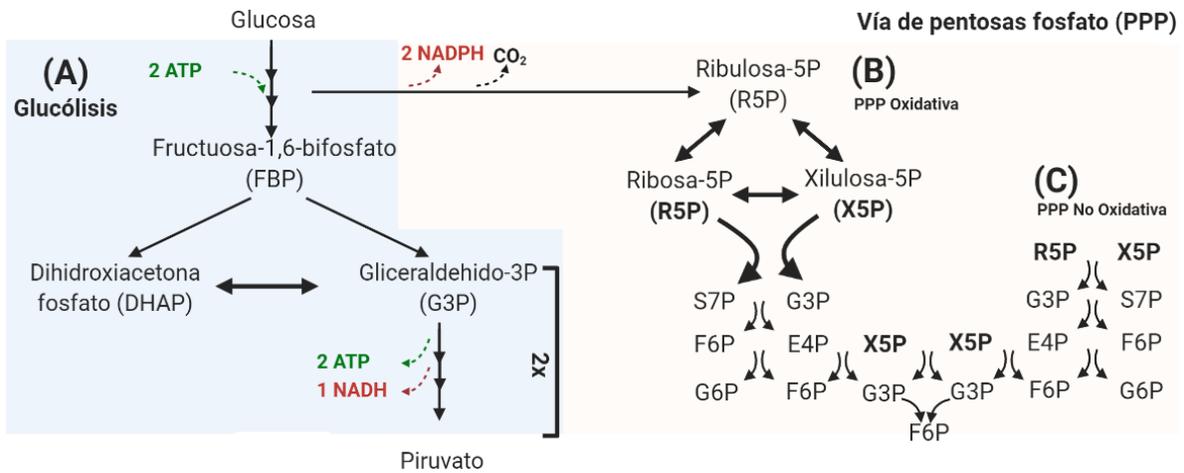


Figura 5: Metabolismo oxidativo de la glucosa. En azul se muestra la glucólisis y en naranja la vía de pentosas fosfato (PPP). S7P: sedoheptulosa-7-fosfato, E4P: eritrosa-4-fosfato, F6P: fructuosa-6-fosfato, G6P: glucosa-6-fosfato.

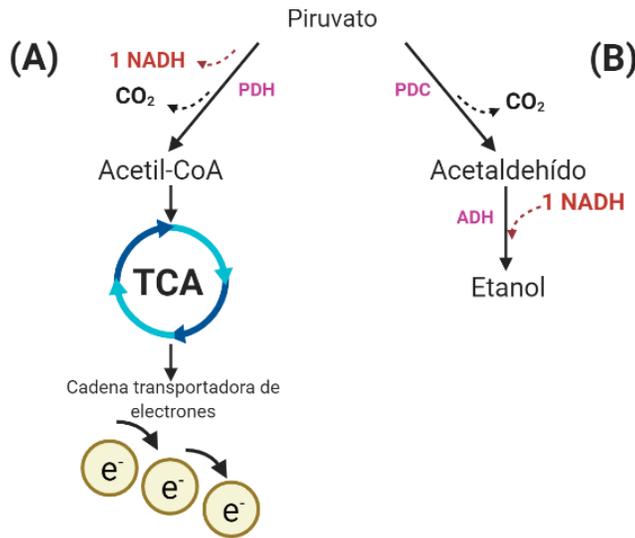


Figura 6: Rol del piruvato en procesos de respiración celular (A) y fermentación (B).

Muchos organismos que no tienen la capacidad de respirar o se encuentran en condiciones con bajo o nulo oxígeno utilizan moléculas orgánicas como aceptores finales de electrones para reoxidar el NAD⁺ generado en la glucólisis, en

un proceso conocido como fermentación (Stanbury et al., 2017). Algunos microorganismos, de entre los que destacan las levaduras, son especialmente eficaces para fermentar la glucosa a etanol y CO₂. En este proceso la glucosa es oxidada a piruvato por la glucólisis y posteriormente el piruvato es reducido a etanol en dos reacciones: el primer paso consiste en una descarboxilación catalizada por la piruvato decarboxilasa (PDC) para producir acetaldehído, el cual es reducido a etanol por la alcohol deshidrogenasa (ADH) (Lehninger et al., 2005) (**Fig. 6, B**). Este es el proceso metabólico que se aprovecha a nivel industrial para la producción de bioetanol.

2.5 Fermentación de la xilosa

La xilosa (C₅H₁₀O₅), es un monosacárido de cinco carbonos que forma parte importante de la hemicelulosa y es el principal producto de su hidrólisis, alcanzando hasta el 34 % de la composición total de la biomasa lignocelulósica.

Hay dos vías metabólicas que los microorganismos utilizan para integrar la xilosa al metabolismo (**Fig. 7**). La primera, utilizada por levaduras como *Pichia stipitis*, es una vía metabólica oxido-reductiva de dos pasos (Karhumaa et al., 2007). Comienza con la reducción de la xilosa a D-xilitol utilizando NADPH o NADH como cofactor por parte de la xilosa reductasa (XR) (codificada por el gen *XYL1*) y posteriormente, la enzima xilitol deshidrogenasa (XDH) (codificada por *XYL2*) actúa usando NAD⁺ como aceptor de electrones para oxidar D-xilitol y producir D-xilulosa (Karhumaa et al., 2007). La segunda alternativa, encontrada comúnmente en bacterias como *Thermus thermophiles*, consiste en la isomerización de la xilosa a D-xilulosa mediada por la enzima xilosa isomerasa (XI) (codificada por el gen *XYLA*), sin el uso de cofactores redox (Kötter & Ciriacy, 1993).

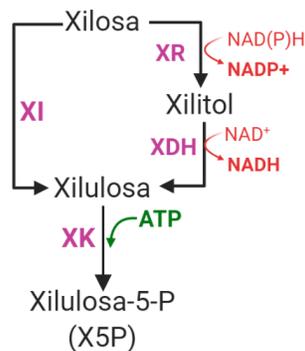


Figura 7: Vías de consumo de xilosa. Vía de Isomerización utilizando la xilosa isomerasa (XI), y vía de oxido-reducción utilizando la xilosa reductasa (XR) y xilitol deshidrogenasa (XDH).

Ambas vías metabólicas convergen en la xilulosa (**Fig. 5**), un metabolito que puede ser fosforilado por la xilulosa cinasa consumiendo ATP para transformarla en xilulosa-5-fosfato y así ser integrada en la parte no oxidativa de la vía de pentosas fosfato (**Fig. 5, C**), para posteriormente ingresar a la glucólisis (Karhumaa et al., 2007) .

A pesar de que la xilosa puede ser fermentada por algunas bacterias, levaduras y hongos, estos microorganismos presentan inconvenientes que limitan su uso en la producción a escala industrial de etanol (Kötter & Ciriacy, 1993). Los casos principales que podemos encontrar son que: 1) la fermentación anaeróbica de xilosa tanto de bacterias como de hongos involucra invariablemente la formación de subproductos como ácidos orgánicos (acetato, formiato, lactato), CO₂ e hidrógeno además del etanol; 2) aunque algunas bacterias como *Zymomonas spp.* o levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* pueden realizar fermentación homoetanólica, no pueden consumir xilosa de forma nativa (Kuyper, Harhangi, Stave, et al., 2003); 3) las levaduras que pueden consumir xilosa de forma nativa, bajo condiciones anaerobias, transforman la mayor parte de la xilosa en xilitol y el rendimiento de etanol es bajo, además se necesita oxígeno para la producción de etanol a partir de xilosa y en estas condiciones se produce a un ritmo bajo (Toivola et al., 1984).

2.6 Sacarificación y fermentación simultánea

En el proceso de obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, la sacarificación y la fermentación se ejecutan de forma independiente y consecutiva (SF), de esta forma cada etapa puede llevarse a cabo en condiciones óptimas de temperatura y pH (**Fig. 8, A**) (Alfani et al., 2000; Choudhary et al., 2017). El mayor obstáculo durante la SF es la inhibición por producto de las enzimas usadas a causa de la acumulación de celobiosa, glucosa, xilosa y xilobiosa y una de las estrategias más estudiadas para superarlo es realizar la sacarificación y la fermentación de forma simultánea (SFS) (**Fig. 8, B**) (Tomás-Pejó et al., 2008). Con esta alternativa, los azúcares liberados por las enzimas hidrolíticas son metabolizados inmediatamente por los microorganismos fermentativos, evitando la inhibición de las enzimas y, en consecuencia, se aumenta el rendimiento de la sacarificación con respecto a la SF (Alfani et al., 2000; Tomás-Pejó et al., 2008; C. E. Wyman, 2007). La SFS también reduce el riesgo de contaminación por la presencia de etanol en el cultivo, y su efecto inhibitorio en las enzimas usadas en la sacarificación es significativamente menor al reducir la concentración de los carbohidratos (Takagi, 1984; C. Wyman et al., 1992). Adicionalmente, al realizar la sacarificación y fermentación en el mismo biorreactor, el costo de la inversión necesaria para construir y operar la planta se reduce hasta en un 20 % (Chen & Wang, 2017).

El proceso de SFS requiere tiempos más cortos (alrededor de 30 horas) en comparación con SF (alrededor de 96 horas), lo que resulta en un aumento en la productividad de etanol (Alfani et al., 2000).

La SFS presenta retos como la inhibición de las enzimas hidrolíticas por la presencia de lignina que, en SF se puede separar antes de la fermentación. Además, los lisados y secreciones celulares (como proteasas) pueden dañar las celulasas y hemicelulasas (Chen & Wang, 2017). Sin embargo, el desafío más grande es que el proceso de hidrólisis enzimática se realiza a temperaturas entre 40 y 50 °C, mientras que la fermentación requiere temperaturas menores a 37 °C (Alfani et al., 2000). Uno de los enfoques más prometedores para conjuntar ambos

procesos es utilizar microorganismos capaces de resistir temperaturas de al menos 40 °C y al mismo tiempo capaces de fermentar glucosa y xilosa.

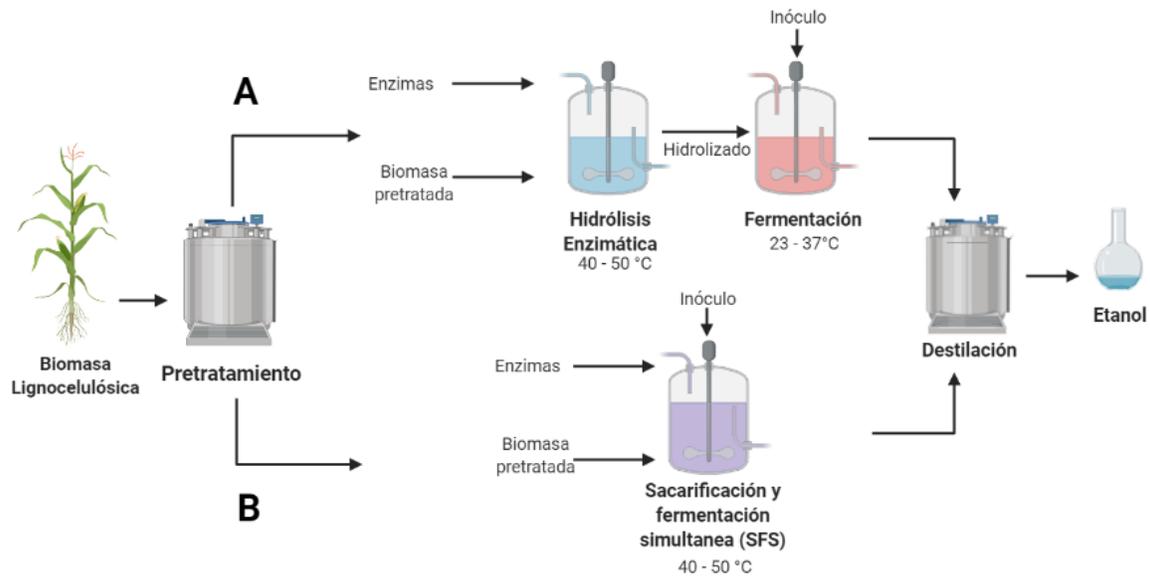


Figura 8: Proceso de sacarificación y fermentación: A) separada (SF), B) simultánea (SFS).

2.7 *Saccharomyces cerevisiae*: su potencial uso en sacarificación y fermentación simultánea de glucosa y xilosa

S. cerevisiae es una levadura de la que se conoce ampliamente su genética y bioquímica y para la que se han desarrollado muchas técnicas de edición genética, análisis genómico, así como procesos en bioingeniería. Sumado a que está catalogada como GRAS (generalmente reconocida como segura, por sus siglas en inglés), no sólo ha sido modelo en investigación básica, sino que se ha podido modificar para conseguir que sea uno de los microorganismos más utilizados en la industria (Caspeta & Castillo, 2017; Jouzani & Taherzadeh, 2015). Esta levadura es

también uno de los microorganismos utilizados comúnmente para la producción de bioetanol porque es homoetanologénica, posee un rendimiento en la producción de etanol a partir de glucosa superior al 95% del máximo teórico (0.51 g/g de glucosa), tiene una considerable tolerancia al etanol (> 120 g/L) y a los inhibidores producidos por la hidrólisis de material lignocelulósico, como derivados de furano, ácidos débiles y compuestos fenólicos, puede crecer a pH ácido y no es afectada por fagos (Caspeta & Castillo, 2017; Ismail et al., 2013; Kasavi et al., 2012; Moysés et al., 2016).

2.7.1 Consumo de xilosa en levaduras modificadas por ingeniería metabólica.

S. cerevisiae no metaboliza xilosa de forma nativa, sin embargo, empleando técnicas de ingeniería genética, se ha logrado conferirle la capacidad de hacerlo. Las estrategias utilizadas para este fin incluyen (**Fig. 9**): I) la inserción de los genes que codifican para las enzimas de la vía oxido-reductiva (xilosa-reductasa [XR] y xilosa-reductasa [XDH]) (Wasylenko & Stephanopoulos, 2015) y/o II) la inserción de los genes que codifican la enzima de la vía de isomerización de la xilosa (xilosa-isomerasa [XI]) (Zhou et al., 2012). Estas vías se conocen por su presencia en otros microorganismos y se pueden usar en esquemas de ingeniería metabólica para completar vías heterólogas en *S. cerevisiae* que le permitan integrar la xilosa a su metabolismo nativo de carbohidratos.

La vía oxido-reductiva de asimilación de xilosa ha sido la más estudiada (Karhumaa et al., 2007). Sin embargo, su implementación requiere un microorganismo con un control preciso del poder reductor. De lo contrario, es muy probable encontrarse con limitaciones metabólicas provocadas por desbalances en los cofactores redox. Esto se debe a que, mientras que la XR puede utilizar NADPH y NADH, presenta mayor afinidad por NADPH, la XDH sólo puede usar NAD⁺. El problema que esto supone se ha resuelto utilizando variantes sintéticas de XR que

sólo utilizan NADH o de XDH que utilizan NADP⁺ (Wasylenko & Stephanopoulos, 2015). Por otro lado, la vía de isomerización presentó problemas en los primeros intentos de utilizarla, pues al expresar heterológamente el gen de la XI de bacterias en *S. cerevisiae*, el plegamiento de la enzima no se realizaba de forma correcta y no se observaba actividad (Wasylenko & Stephanopoulos, 2015). Este inconveniente fue resuelto utilizando la XI de *Piromyces sp.* y posteriormente la de bacterias como *Burkholderia cenocepacia* (Harhangi et al., 2003; Kuyper, Harhangi, Stave, et al., 2003; Vilela et al., 2015).

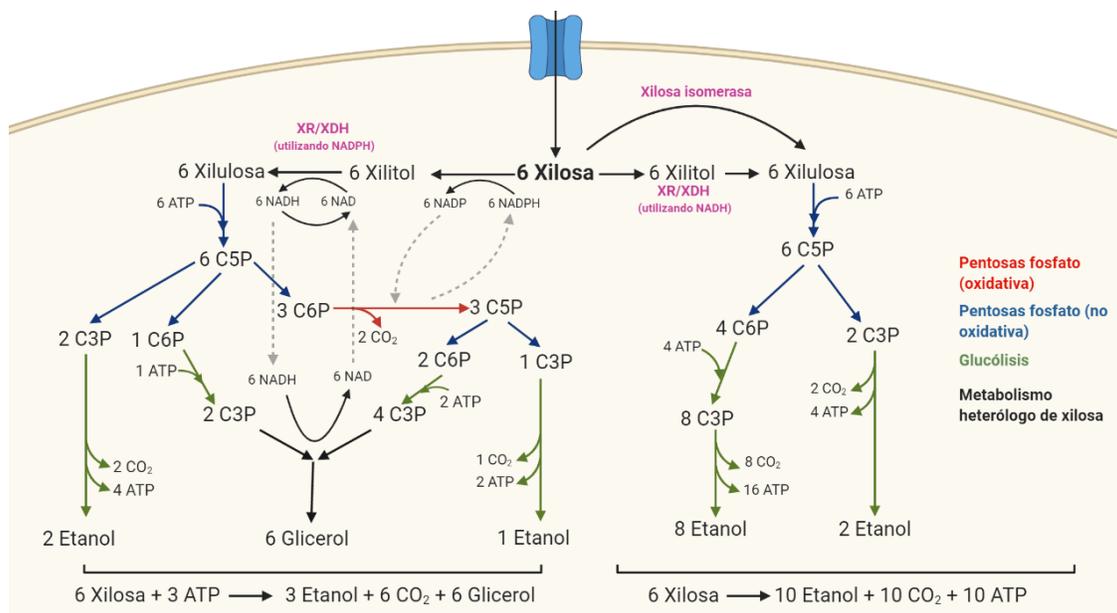


Figura 9: Vías heterólogas de consumo de xilosa en *S. cerevisiae* y balance estequiométrico en cada una. A la izquierda: vía oxido-reductiva en la que se utiliza NADPH como cofactor para reducir xilosa a xilitol. A la derecha: vía de isomerización (equivalente a la vía oxido-reductiva utilizando NADH como cofactor de XR).

Las dos vías metabólicas convergen en la D-xilulosa, metabolito que puede ser asimilado por *S. cerevisiae* de forma nativa (Fig. 7). Esta molécula es fosforilada por la xilulosa cinasa (XK) para producir D-xilulosa-5 fosfato (C5P) y, mediante la vía no oxidativa de pentosas fosfato (PPP), se transforma en fructuosa-6 fosfato (C6P) y gliceraldehido 3-fosfato (C3P) en una proporción dos a uno (Wasylenko &

Stephanopoulos, 2015). Ambos compuestos son metabolizados por la vía de glucólisis y transformados en piruvato, el cual será fermentado posteriormente para producir etanol. En este proceso se han detectado varios puntos que parecen limitar la conversión eficiente de xilosa a etanol en levaduras como lo son: la internalización de xilosa por los transportadores inespecíficos de hexosas HXT2 y HXT7, (Vilela et al., 2015; Walfridsson et al., 1995); la fosforilación de xilulosa a X5P por la xilulosa cinasa (Ha et al., 2011); las transaldolasas y transcetolasas de la vía no oxidativa de pentosas fosfato (Vilela et al., 2015); la conversión de gliceraldehido-3 fosfato a piruvato y la conversión de piruvato a etanol (Wasylenko & Stephanopoulos, 2015); por lo que se ha buscado optimizarlos y reducir la limitación que presuponen, mediante estrategias de ingeniería metabólica y estrategias de ingeniería cultivos.

2.7.2 Levaduras termotolerantes generadas por ingeniería metabólica inversa

S. cerevisiae requiere temperaturas entre 30 y 35 °C para realizar la fermentación de carbohidratos y maximizar su conversión a etanol (Ismail et al., 2013). Este rango de temperaturas representa un impedimento para utilizar este microorganismo en procesos de SFS. Una cepa termotolerante, capaz de soportar temperaturas superiores a la temperatura máxima de la cepa silvestre (37°C para esta levadura), permitiría acoplar los procesos de sacarificación y fermentación.

Mediante evolución adaptativa en laboratorio, Caspeta y colaboradores (2014) obtuvieron varias cepas de *S. cerevisiae* capaces de fermentar glucosa eficientemente a 40 °C (Caspeta et al., 2014). Del análisis multi "ómico" de las cepas termotolerantes se encontró que la composición, proporción y estructura de los esteroides presentes en la membrana plasmática tienen papeles importantes en la protección de la levadura ante temperaturas elevadas. Esta característica se asoció directamente a la pérdida de la función de la proteína codificada en el gen que codifica una desaturasa de esteroles (*ERG3*), el cual obtuvo una mutación sin sentido

provocando una proteína truncada. Esto provocó un cambio en la proporción de esteroides presentes en las membranas de la levadura. Por ejemplo, la disminución en la proporción de ergosterol aunada al incremento en la proporción de fecosterol, el cual presenta dobleces parecidos al de lípidos de membrana encontrados en arqueas termotolerantes y plantas. En este estudio también se encontró una reducción en la expresión de los principales internalizadores de hexosas (*HXT2*, *HXT5* y *HXT7*) de *S. cerevisiae*, y la transcetolasa *TLK2* de la vía no oxidativa de pentosas fosfato; así como un aumento en el flujo de carbono en la glucólisis y en la producción de etanol y una reducción en el flujo del ciclo de ácidos tricarbónicos (TCA). Todos estos son cambios que pueden ser críticos en la metabolización de xilosa en levaduras (**Figs. 5, 9**).

Dado lo anterior, en este trabajo buscamos generar cepas de *S. cerevisiae* capaces de metabolizar xilosa por la vía de isomerización y producir etanol a temperaturas de 40 °C o superiores. Para cumplir con estos propósitos, primero se realizó la eliminación de *ERG3* en una cepa silvestre de *S. cerevisiae* para conferirle termotolerancia. Posteriormente, se le confirió la capacidad de consumo de xilosa por la vía de isomerización mediante la expresión del gen de xilosa isomerasa (*XYLA*) de *Piromyces sp.* en *S. cerevisiae* mediante un vector de expresión. Finalmente, se evaluó la capacidad de metabolizar xilosa y producir etanol a elevada temperatura de la cepa generada.

3. JUSTIFICACIÓN

El metabolismo de xilosa a temperaturas mayores de 40 °C no sólo permitirá aprovechar una fracción mayor de azúcares presentes en los materiales lignocelulósicos, sino también abre la posibilidad de realizar simultáneamente los procesos de sacarificación y fermentación, reduciendo los costos en el proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica.

Para que esto sea posible es imprescindible entender cómo funciona el metabolismo heterólogo de la xilosa en *S. cerevisiae* durante la producción de etanol a temperatura elevada.

Hasta ahora se han estudiado los cambios en el metabolismo de glucosa a altas temperaturas, sin embargo, en este proyecto se busca entender los cambios en el metabolismo de xilosa a temperatura elevada.

4. OBJETIVO GENERAL

Generar cepas de la levadura *S. cerevisiae* capaces de transformar xilosa en etanol a elevada temperatura.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar cepas de *S. cerevisiae* tolerantes a temperatura igual o superior a 40 °C mediante la delección del gen *ERG3*
- Generar cepas de *S. cerevisiae* capaces de metabolizar xilosa mediante la ruta de la xilosa isomerasa.
- Generar cepas tolerantes a elevada temperatura, que puedan transformar la xilosa en etanol.

6. HIPÓTESIS

Mediante la inserción del gen *XYLA* de *Piromyces sp.* E2 y la eliminación del gen *ERG3*, *S. cerevisiae* adquirirá la capacidad de metabolizar xilosa a temperatura elevada.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos.

Las cepas de *S. cerevisiae*, los plásmidos utilizados para su transformación y los oligonucleótidos empleados para realizar los experimentos de recombinación se describen detalladamente en la **Tabla 3**. En esta tabla también se refiere la obtención de este material.

Tabla 3: Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Cepa/ plásmido/ oligo	Características	Referencia
W3031A	Cepa de <i>S. cerevisiae</i> tipo silvestre. Características principales: haploide, MATa, auxotrofías a adenina, uracilo, histidina, triptófano y leucina y resistencia a canavanina. ATCC 208352. Genotipo: MATa, ADE2-1, URA3-1, HIS3-11, TRP1-1, LEU2-3, LEU2-112, CAN1-100.	(Petrezselyova et al., 2010)
WSCB02	Cepa de <i>S. cerevisiae</i> derivada de la cepa silvestre W3031A. Obtenida de la sustitución del gen <i>ERG3</i> por la unidad transcripcional del marcador de selección <i>KanMX</i> (promotor y terminador <i>TEF1</i>). Genotipo: MATa, ADE2-1, URA3-1, HIS3-11, LEU2-3, LEU2-112, CAN1-100, <i>ERG3::KanMX</i> .	Este trabajo
XL1Blue	Cepa silvestre de <i>Escherichia coli</i> resistente a Ácido nalidíxico y tetraciclina. Cepa comercial obtenida de <i>Agilent Technologies</i> . Genotipo: <i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F[::Tn10 proAB⁺ lac^P Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K m_K⁺)</i> .	<i>Agilent Technologies</i>
pJET1.2/ blunt	Vector de clonación comercial con origen de replicación para <i>Escherichia coli</i> (<i>ori</i>), diseñado para clonaciones de insertos con extremos <i>blunt</i> . Confiere resistencia a Ampicilina.	<i>Thermo Scientific</i>
pJETXYLA	Plásmido derivado del vector pJET1.2/blunt. Contiene la unidad transcripcional del gen <i>XYLA</i> (promotor <i>TEF1</i> y el terminador <i>CYC1</i>) clonada en el sitio de clonación múltiple.	Este trabajo
pSAL4	Vector de clonación con origen de replicación para <i>E. coli</i> (<i>ori</i>), origen de replicación para el bacteriófago f1 y origen de replicación 2μ para levaduras. Contiene el marco de lectura <i>URA3</i> bajo el control de su promotor nativo; restaura la auxotrofia a uracilo en levaduras causado por la deleción del gen <i>URA3</i> o por productos defectuosos del mismo. Confiere resistencia a ampicilina en <i>E. coli</i> .	Salas Navarrete, datos no publicados.
pUG6	Vector de clonación comercial con origen de replicación para <i>E. coli</i> , contiene la unidad transcripcional del marcador de selección <i>KanMX</i> (confiere resistencia a G418), bajo el control del promotor y terminador <i>TEF1</i> ,	Dr. Paul Rosas Santiago. IBT UNAM.

	flanqueada por sitios <i>loxP</i> en sentido 5' a 3'. Confiere resistencia a ampicilina.	
Oligo 1: ERG3_KanMX X	5' ATGGATTTGGTCTTAGAAGTCGCTGACCATTATGTCT TAGACGACTTGTACGCGGCCGCCAGCTGAAGCT 3'	Este trabajo
Oligo 2: KanMX_ERG 3	5' TCAGTTGTTCTTCTTGGTATTTGGGTCGTTTTTCATAG ATTCTATCATTATGACCGGCAGATCCGCGGCCG 3'	Este trabajo
Oligo 3: ERG3_FW	5' AGCGATCGGGTATTGTTGTTGC 3'	Este trabajo
Oligo 4: ERG3_RV	5' GTTGTTTATGGACGGTAGTGAGTCG 3'	Este trabajo
Oligo 5: XYLA_pSAL 4_FW	5' GTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCTGCTCG AAGGCTTTAATTTG 3'	Este trabajo
Oligo 6: pSAL4_RV	5' GCGCCCAAATGTCGGTAATG 3'	Este trabajo
Oligo 7: pSAL4_XYL A_FW	5' CGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGGATCCCATTAC CGACATTTGGGCGCCATAGCTTCAAATGTTTCT 3'	Este trabajo
Oligo 8: XYLA_RV	5' GCAAATTAAGCCTTCGAGC 3'	Este trabajo

7.2 Medios de cultivo

7.2.1 Medio DELFT

La composición del medio mínimo líquido DELFT fue, por litro: 5 g $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$, 3 g KH_2PO_4 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, además se adicionó 1 mL de solución de elementos traza y 1 mL de solución de vitaminas. Como fuente de carbono se utilizaron 20 g/L de glucosa (DEFLT_{G20}) o 20 g/L xilosa (DELFTX₂₀). El pH final del medio fue ajustado a 6.

La composición de la solución de elementos traza por litro fue: 4.5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.5 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g H_3BO_3 , 0.84 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g KI, y 15 g EDTA.

La composición de la solución de vitaminas por litro fue: 50 mg biotina, 200 mg p-ácido aminobenzoico, 1g ácido nicotínico, 1 g de pentanoato de calcio, 1 g clorhidrato de piridoxina, 1 g clorhidrato de tiamina, y 25 g myo-inositol.

Para complementar las auxotrofías de las cepas utilizadas, el medio DELFT fue suplementado con adenina (100 mg/L), L-triptófano (75 g/L), L-leucina (500 mg/L) y/o L-histidina (125 mg/L), según se requería (Pronk, 2002). En algunos experimentos se adicionó uracilo (150 mg/L), estos casos serán indicados en el texto e imágenes.

7.2.2 Medio YNB

El medio mínimo YNB se compró a *Becton Dickinson and Company* y se utilizaron 0.67 g/L para todas las preparaciones. Se utilizó glucosa y/o xilosa como fuente de carbono en distintas concentraciones, dando lugar a los medios: YNBG₂₀ (20 g/L de glucosa), YNBX₂₀ (20 g/L de xilosa), YNBX₅₀ (50 g/L de xilosa), YNBX₅₀G₅ (50 g/L de xilosa y 5 g/L de glucosa), y YNBX₅₀G₂ (50 g/L de xilosa y 2 g/L de glucosa). El pH final del medio fue ajustado a 6 con NaOH 5N. Se agregaron 40g/L de agar/agar para preparar medio sólido.

Para complementar las auxotrofías de las cepas utilizadas, los medios YNB fueron suplementados con adenina (100 mg/L), L-triptófano (75 g/L), L-leucina (500 mg/L) y L-histidina (125 mg/L) (Pronk, 2002). También se agregó uracilo (150 mg/L) en algunos experimentos, estos casos serán notificados oportunamente en el texto e imágenes.

7.2.3 Medio YPD

El medio rico YPD se preparó con 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona y 20 g/L de glucosa. Para preparar medio sólido se utilizaron 20 g/L de agar/agar. El pH final del medio fue ajustado a 6 con NaOH 5N.

En algunos experimentos, el medio fue suplementado con 800 mg/L de G418 (Geneticina). Este antibiótico sirvió para la selección de cepas modificadas por recombinación homóloga, como se describe adelante.

7.2.4 Medio LB

El medio Luria-Bertani para el cultivo de bacterias (LB) fue preparado con 10 g/L de bacto-triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl, 1 g/L de glucosa. El pH fue ajustado a 7.0 con NaOH 5N. Para preparar medio sólido se agregaron 15 g/L de bacto-agar. En todos los experimentos a este medio se adicionaron 100 mg/L de Carbenicilina (LB-Cb).

7.3 Métodos de cultivo, muestreo y preparación de las muestras

Todos los cultivos de los experimentos principales se realizaron en matraces *Erlenmayer* con 4 deflectores y volúmenes nominales de 125 mL y 500 mL. Para mantener proporciones 1 a 10 de los volúmenes del cabezal de aire y el medio de cultivo se usaron volúmenes de llenado de 12.5 mL y 50 mL respectivamente. Los preinóculos crecidos para ser usados como inóculos en los experimentos principales se prepararon en tubos de 16 x 150 mm con 4 mL de medio.

Todos los cultivos sin agitación se realizaron en una incubadora *Yamato* modelo IC100. Los cultivos con agitación se realizaron en una incubadora *New Brunswick Scientific Co* modelo G24. Las muestras para el análisis por HPLC fueron centrifugadas inmediatamente después de ser colectadas por 1 minuto a 16,873 G (14,000 rpm) en una microcentrífuga *Eppendorf* modelo 5418. El sobrenadante fue filtrado utilizando filtros *Thermo Scientific* de 0.2 mm y almacenado a -20 °C.

7.4 Métodos analíticos

7.4.1 Cuantificación de biomasa.

La densidad celular de las muestras, las cuales fueron diluidas apropiadamente, fue monitoreada midiendo la absorbancia a 600nm (OD₆₀₀) utilizando un espectrofotómetro *Thermo Scientific* modelo GENESYS 10s UV-Vis. La concentración de biomasa se calculó usando una correlación experimental entre el peso seco de la biomasa (DCW) y la OD₆₀₀ obtenida (**Apéndice F**).

7.4.2 Cuantificación de glucosa, xilosa y metabolitos de fermentación.

La concentración de glucosa, xilosa, etanol, glicerol y acetato fue determinada utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Para esto se utilizó un equipo de HPLC marca *Agilent* serie 1200, acoplado a un detector de índice de refracción modelo 2410 y a un detector de arreglo de diodos modelo 996, ambos de la marca *Watters*. Para la separación de los analitos se utilizó la columna Aminex HPX-87H de la marca *BioRad*. La columna se operó con un flujo de 0.6 mL/min de la fase móvil conteniendo ácido sulfúrico 5 mM y con 50 mg/L de azida de sodio para evitar el crecimiento de microorganismos. La temperatura de trabajo de la columna fue de 65 °C.

7.4.3 Cuantificación de DNA.

La concentración y calidad del DNA en las muestras utilizadas para las modificaciones genéticas o el análisis de estas se estimó utilizando un *NanoDrop 2000* de la marca *Thermo Scientific* usando el programa Thermo software IQ provisto por el fabricante.

El DNA analizado en gel de agarosa fue teñido con bromuro de etidio (EtBr). La concentración de EtBr utilizada en el gel fue de 0.5 mg/mL. Se utilizó el fotodocumentador *ChemiDoc XR+* de la marca *BioRad* para analizar las bandas de DNA presentes en los geles.

La construcción *in silico* de los plásmidos y las figuras de estos se realizaron utilizando el software *SnapGene* 4.2.11 (de *Insightful Science* disponible en snapgene.com). El resto de las figuras se realizaron utilizando el software *Biorender* (disponible en BioRender.com).

7.5 Métodos para la manipulación del DNA.

7.5.1 Eliminación del gen *ERG3* para obtener la cepa termo-tolerante WSCB02

Para la generación de una cepa termo tolerante de *S. cerevisiae* se partió de la cepa tipo silvestre W3031A. A esta se le sustituyó el marco de lectura del gen *ERG3*, de 1089pb, ubicado en el cromosoma XII en la posición 253861 a 254958. Para este fin se utilizó el método de recombinación homóloga descrito por A. Baudin en 1993 (Baudin et al., 1993), el cual aprovecha el sistema endógeno de *S. cerevisiae* para reparación de brechas de doble cadena (DSBs, por sus siglas en inglés) en el DNA cromosomal compuesto principalmente por el sistema molecular de reparación conocido como Rad52 (Aylon & Kupiec, 2004).

La sustitución se hizo por el casete *KanMx* de 1541 pb, que confiere resistencia a G418 (De Antoni & Gallwitz, 2000) (**Fig. 10**). Este marcador de selección consiste en el gen *KanMX* (810 pb), flanqueado por el promotor *TEF1* (344 pb), el terminador *TEF1* (198 pb) y dos sitios *loxP* en sentido 5' a 3' flanqueando la secuencia completa (Ghosh & Van Duyne, 2002).

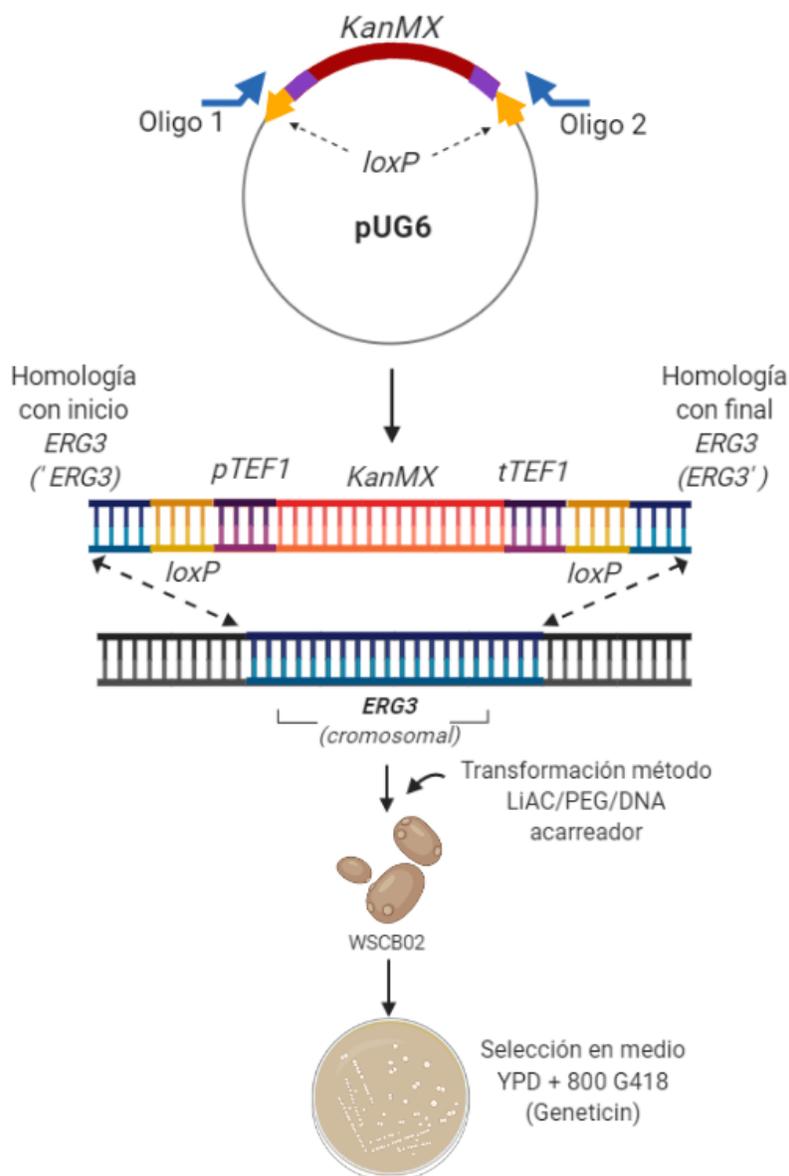


Figura 10: Estrategia para la sustitución del gen *ERG3* por la secuencia *loxP-kanMX-LoxP*.

El casete de resistencia *KanMX* flanqueado por los sitios *loxP* fue amplificado del vector *pUG6* utilizando los oligos 1 y 2 (Tabla 3, Fig. 11). El oligo 1 se diseñó con 50 pb de homología con el inicio de *ERG3* y 20 pb de homología con el inicio del casete *KanMX* mientras que el oligo 2 tiene 20 pb con el final del casete *KanMX*. Lo anterior considerando el funcionamiento del sistema de reparación de DSBs, y

que la cepa utilizada no posee el marco de lectura *KanMX* en su genoma, además de las recomendaciones hechas en la técnica propuesta por Baudin et. al 1993. Se utilizaron las condiciones de reacción descritas en las **Tablas 4 y 5** para amplificar esta unidad transcripcional.

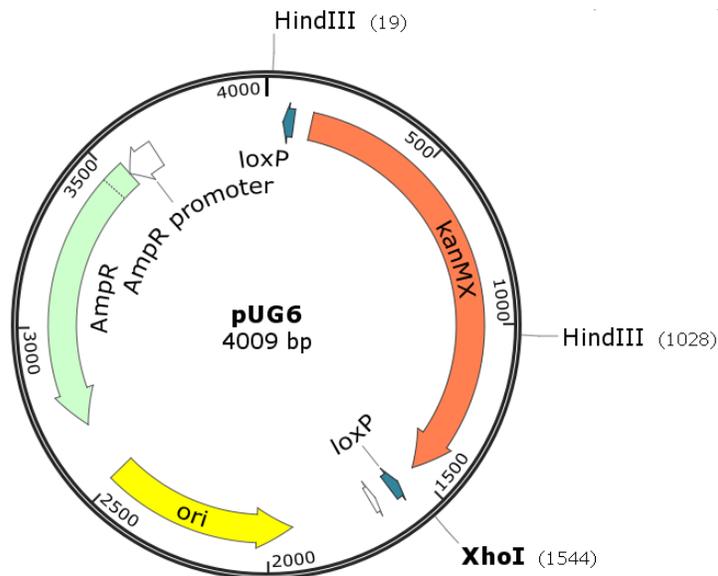


Figura 11: Mapa del vector pUG6, el cual contiene el marcador de selección flanqueado por sitios *loxP* utilizado para sustituir al gen *ERG3*.

Tabla 4: Volumen de soluciones para la reacción de PCR usada para amplificar el marcador *KanMX* a partir de plásmido pUG6, volumen total 250 μ L.

Reactivo	Volumen
Agua MilliQ	150 μ L
Amortiguador 5x Phusion HF (<i>Thermo Scientific</i>)	50 μ L
dNTP 10 mM c/u (<i>Thermo Scientific</i>)	5 μ L
Oligo 1 (F) 1 μ M (10 pmol/ μ L)	6.2 μ L
Oligo 2 (R) 1 μ M (10 pmol/ μ L)	6.25 μ L
DNA molde (pUG6 1ng/ μ L)	30 μ L
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ μ L) (<i>Thermo Scientific</i>)	0.5 μ L (1U)

Tabla 5: Programa de PCR utilizado para amplificar el marcador *KanMX* a partir de plásmido pUG6. Se realizaron 35 ciclos del paso 2 al 4.

Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5	Paso 6
98 °C 1 min	98 °C 30 seg	55 °C 1 min	72 °C 2 min	72°C 5 min	12 °C

Utilizando 2 µg de producto de PCR se realizó la transformación de 1×10^8 células quimio-competentes de la cepa silvestre W3031A siguiendo el método de acetato de litio (LiAc), PEG y DNA acarreador descrito por (Gietz & Schiestl, 2008). En este protocolo se generan células quimio-competentes al permear la pared celular con LiAc, lo cual favorece la entrada del DNA transformante y el DNA acarreador por un choque térmico. El DNA acarreador funciona como un señuelo para las nucleasas y promueve que el DNA transformante, que se encuentra en menor proporción, no sea degradado y pueda permear la membrana nuclear. La mezcla de transformación utilizada se describe en la **Tabla 6**. El choque térmico se realizó a 42 °C por 90 minutos.

Tabla 6: Mezcla de soluciones usada en la transformación por el método de acetato de litio.

Reactivo	Volumen
PEG 3350 (50 % (w/v))	240 µL
LiAc 1.0 M	36 µL
DNA acarreador de cadena noble (dsDNA acarreador) 2 mg/µL	50 µL
DNA (producto PCR 200 ng/µL)	10 µL
TE 10x	36 µL
DMSO	18 µL
TOTAL	390 µL

El volumen total de células transformadas fue concentrado a 100 µL, sembrado en una caja Petri con medio YPD y 800 mg/L de G418, e incubado a 30 °C durante 6 días. Sólo las células que integrarán la secuencia *loxP-KanMX-loxP* a su genoma podrán sobrevivir en este medio de selección.

Como control positivo de la transformación previamente descrita, se utilizó 1 ng de pSAL4 para transformar 1×10^8 células quimio-competentes de la cepa W3031A con el mismo protocolo. Las células transformadas fueron concentradas

en 100 µL y sembradas en una caja Petri con medio YNBG₂₀ la cual se incubó a 30 °C durante 2 días.

Para comprobar que la secuencia *loxP-KanMX-loxP* fuera integrada en el locus de *ERG3*, se comprobó molecularmente el remplazo *ERG3::loxP-KanMX-loxP* en cuatro candidatas seleccionadas aleatoriamente de la caja de Petri con la población transformada. A estas colonias y a una colonia de la cepa W03031A (utilizada como control) se les extrajo su DNA genómico (gDNA) siguiendo el protocolo de (Lööke et al., 2017). La sustitución en las candidatas seleccionadas fue comprobada por PCR (condiciones descritas en **Tablas 7 y 8**). Para esta comprobación se diseñaron los oligos 3 (22pb) y 4 (25pb) mostrados en la **Tabla 3**. Utilizando estos oligos para la comprobación molecular, se esperaba un fragmento de 1826 pb para la cepa tipo silvestre W3031A y de 2268 para la cepa carente del gen *ERG3* (Δ *ERG3*), nombrada WSCB02 (*ERG3::loxP-KanMX-loxP*). Se utilizó como control de la reacción de PCR de comprobación el gDNA previamente extraído y probado de la cepa W3031A.

Tabla 7: Volumen de componentes de la reacción de PCR para comprobar la sustitución del gen *ERG3* a partir de gDNA.

Reactivo	Volumen
Agua MilliQ	33 µL
Amortiguador 5x Phusion HF (<i>Thermo Scientific</i>)	10 µL
dNTP 10 mM c/u (<i>Thermo Scientific</i>)	1 µL
Oligo 3 (F) 1 µM (10 pmol/µL)	1.25 µL
Oligo 4 (R) 1 µM (10 pmol/µL)	1.25 µL
DNA molde (gDNA W30301A o candidata WSCB02 200 ng/µL)	3 µL
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2U µL) (<i>Thermo Scientific</i>)	0.5 µL (1U)

Tabla 8: Programa de PCR utilizado para comprobar sustitución de *ERG3* a partir de gDNA.

Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5	Paso 6
98 °C 1 min	98 °C 30 seg	55 °C 1 min	72 °C 2 min	72 °C 5 min	12 °C

El producto de la reacción de PCR fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.5 % y visualizado en cámara de luz UV para verificar la sustitución de *ERG3*. Las candidatas con la sustitución fueron nombradas WSCB02.

7.5.2 Diseño del marco de lectura e integración del gen *XYLA* al genoma de *S. cerevisiae*

De la base de datos GeneBank se obtuvo la secuencia del gen xilosa isomerasa *XYLA* de *Piromyces sp. E2* (1669 pb), con el código de acceso AJ249909 (Kuyper, Harhangi, Stave, et al., 2003). De la secuencia extraída de las bases de datos, se descartaron los primeros 4 bp, correspondientes a la región 5' no codificante que incluye el residuo metionina N-terminal, y los últimos 351 pb, que forman parte de la región 3' no codificante rica en AT comúnmente encontrada en hongos anaerobios (Kuyper, Harhangi, Stave, et al., 2003). Se consideró el marco de lectura de *XYLA* sólo la secuencia restante de 1314 pb (**Apéndice A**).

Se realizó la armonización de codones del marco de lectura de *XYLA* según la metodología descrita por Evelina Angov en 2008 (Angov et al., 2008). En este procedimiento, se reemplazaron sus codones por codones sinónimos con frecuencias de uso idénticas o similares en *S. cerevisiae*, buscando que la dinámica de traducción y plegamiento de la proteína heteróloga sea lo más parecido posible a como sería en *Piromyces sp. E2*. Las tablas de uso de codones reportadas para *S. cerevisiae* y *Piromyces sp. E2* fueron obtenidas de la base de datos *Kazusa Codon Usage Database* (<https://www.kazusa.or.jp/codon/>). La sustitución de codones se realizó mediante un algoritmo programado para sustituir los codones del gen *XYLA* original por los codones correspondientes, en frecuencia de uso, a la de *S. cerevisiae* (Apéndice B).

Se comparó la secuencia obtenida de la armonización de codones contra la base de datos de *NCBI* utilizando las herramientas *BLASTn* y *BLASTx* para comprobar la identidad correcta del gen *XYLA* armonizado.

El marco de lectura armonizada de *XYLA* fue ensamblado, *in silico*, con el promotor *TEF1* en la región 5' y el terminador *CYC1* en la región 3'. Adicionalmente, fueron añadidos sitios de corte de la enzima *XhoI* en cada extremo de la construcción; obteniendo así la unidad transcripcional *XYLA* (**Fig. 12**). La secuencia generada *in silico* fue sintetizada en un *GeneBlock* (*gBlock*), un fragmento de DNA bacteriano bicatenario con extremos romos, por la compañía *Integrated DNA Technologies* (IDT).



Figura 12: Estrategia para ensamblar *in silico* la unidad transcripcional *XYLA* compuesta por el promotor *TEF1*, la secuencia armonizada del marco de lectura del gen *XYLA*, el terminador *CYC1* y sitios de corte de *XhoI* en los extremos.

7.5.3 Clonación de la unidad transcripcional *XYLA* en el vector pJET1.2/Blunt

El *gBlock* con la unidad transcripcional *XYLA* fue clonado en el vector pJET1.2/Blunt utilizando el kit *Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit* y siguiendo las indicaciones del fabricante (**Fig. 13**). El producto de la ligación se utilizó para transformar células electro-competentes de *E. coli* XL1Blue por electroporación. Las células fueron preparadas y electro-transformadas siguiendo el protocolo descrito en el **Apéndice C**.

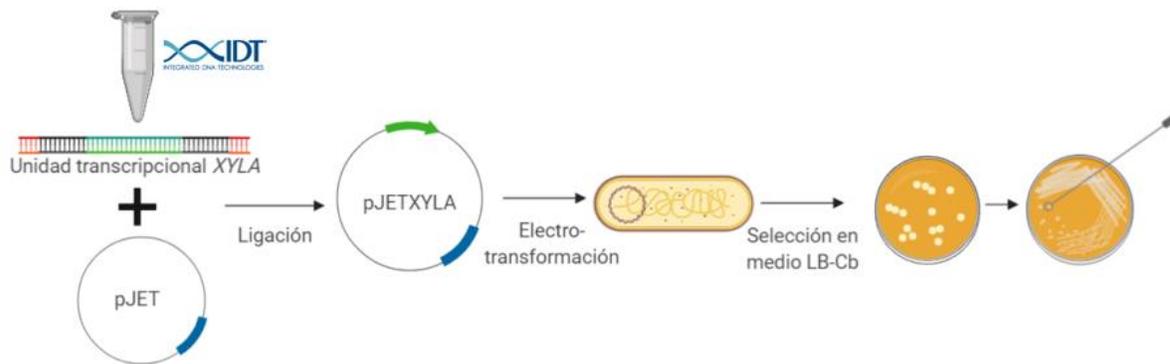


Figura 13: Estrategia para obtención de vector pJETXYLA: clonación de unidad transcripcional XYLA sintetizada por IDT en vector pJET1.2/Blunt y posterior selección en medio rico con Carbenicilina.

Un volumen de 10 μL de células transformadas fueron sembradas en una caja Petri con medio LB-Cb sólido e incubadas por 16 horas a 37 °C. Se seleccionaron 6 colonias las cuales fueron transferidas a una nueva caja Petri con medio LB-Cb sólido e incubada nuevamente por 16 horas a 37 °C. Se transfirieron colonias aisladas a tubos de ensayo de 20 mL con 2 mL de medio LB-Cb líquido. Éstos fueron incubados a 37 °C y 300 rpm durante 12 horas. Se extrajo el DNA plasmídico de la población celular contenida en cada tubo. Esto se realizó mediante la técnica de lisis alcalina descrita en el **Apéndice D**. Luego se midió la cantidad y calidad de DNA extraído. El DNA plasmídico se concentró hasta 500 ng/ μL .

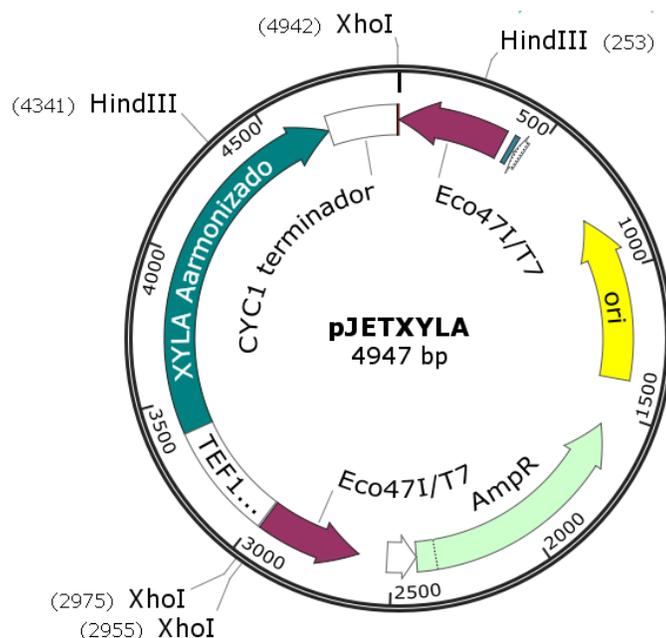


Figura 14: Mapa del vector pJETXYLA resultado de la clonación de la unidad transcripcional XYLA en el sitio múltiple de clonación del vector pJET1.2/Blunt.

Para confirmar la clonación de la unidad transcripcional XYLA en el vector pJET1.2/Blunt, se realizó una digestión con XhoI del DNA plasmídico extraído con las condiciones mostradas en la **Tabla 9**. El vector resultante de la ligación se nombró pJETXYLA (**Fig. 14**).

Tabla 9: Condiciones de reacción de la digestión enzimática del vector pJETXYLA, volumen total 20 μL . La reacción se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos.

Reactivo	Volumen de digestión con XhoI
Agua MilliQ	15.5 μL
Amortiguador RED 10x (<i>Thermo Scientific</i>)	2 μL
DNA plasmídico (500 ng/ μL)	2 μL
XhoI (10 U/ μL) (<i>Thermo Scientific</i>)	0.5 μL

7.5.4 Construcción del vector pSCBXYLA

Para construir el vector de expresión que pueda replicarse en *S. cerevisiae* y que contenga la unidad transcripcional de *XYLA* se diseñó una estrategia de recombinación homóloga basada en la técnica de van Leeuwen, Andrews, Boone, & Tan, 2015 (**Fig. 15**). Esta técnica tiene como objetivo ensamblar un plásmido circular dentro de la levadura al transformarla con fragmentos lineales que tengan extremos homólogos entre ellos y que sean apropiados para servir como sustrato del sistema de reparación recombinacional compuesto principalmente por el complejo Rad52. Se partió del vector pSAL4 (6140 pb) con origen de replicación para *E. coli* y origen de replicación 2 μ para levaduras (**Fig. 16**) y el vector pJETXYLA (**Fig. 14**).

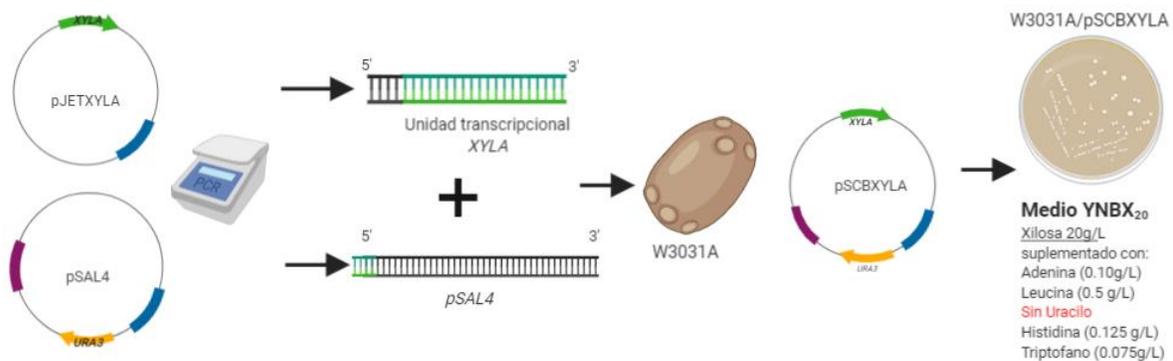


Figura 15: Estrategia para ensamblar el vector pSCBXYLA que confiera a la cepa W3031A la capacidad de consumir xilosa por la vía de isomerización y restaure la auxotrofia a uracilo.

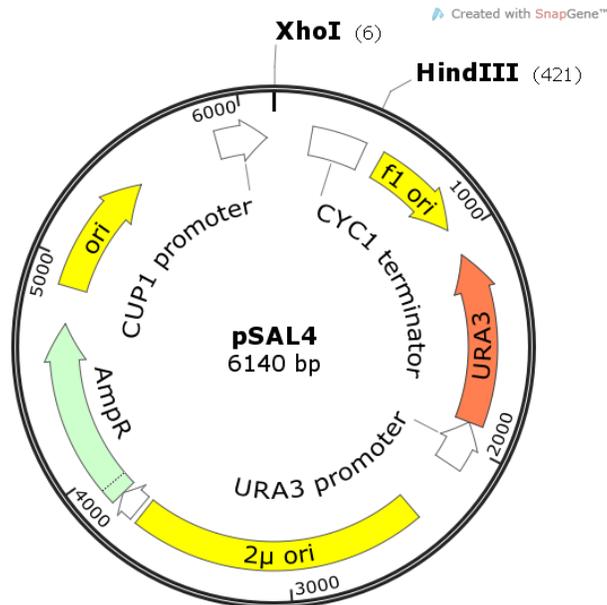


Figura 16: Mapa del vector pSAL4 con origen de replicación para levaduras y bacterias. Completa la auxotrofia a uracilo en levaduras *URA3*- y confiere resistencia a Ampicilina en bacterias.

En primer lugar, se amplificó el vector pSAL4 utilizando los oligos 5 y 6 (**Tabla 3**). El oligo 5 fue construido con 50 pb de homología con el extremo 3' de la unidad transcripcional *XYLA* y 20 pb de homología con inicio del del vector pSAL4. El oligo 6 fue diseñado con 20 pb de homología con el final pSAL4.

Para amplificar la unidad transcripcional *XYLA* a partir de pJETXYLA se utilizaron los oligos 7 y 8 (**Tabla 3**). El primero en sentido *forward* con 50 pb de homología con el final de pSAL4 y 20 pb de homología con el extremo 5' de la unidad transcripcional *XYLA*. El segundo en sentido *reverse* con 20 pb de homología con el extremo 3' de la unidad transcripcional *XYLA*. Las condiciones para la reacción de PCR se muestran en las **Tablas 10 y 11**.

Tabla 10: Volumen de componentes de la reacción de PCR para amplificar el vector pSAL4 con los oligos 5 y 6 o la unidad transcripcional XYLA a partir de pJETXYLA con los oligos 7 y 8

Reactivo	Volumen
Agua MilliQ	33 μ L
Amortiguador 5x Phusion HF (<i>Thermo Scientific</i>)	10 μ L
dNTP 10 μ M c/u (<i>Thermo Scientific</i>)	1 μ L
Oligo 5 ó 7 (F) 1 μ M (10 pmol/ μ L)	1.25 μ L
Oligo 6 u 8 (R) 1 μ M (10 pmol/ μ L)	1.25 μ L
DNA molde (pSAL4 o pJETXYLA 2 ng/ μ L)	3 μ L
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ μ L) (<i>Thermo Scientific</i>)	0.5 μ L (1U)

Tabla 11: Programa de PCR utilizado para amplificar el vector pSAL4 o la unidad transcripcional XYLA.

Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5	Paso 6
98 °C 1 min	98 °C 30 s	55 °C 1 min	72 °C 2 min (pJETXYLA) 6 min (pSAL4)	72 °C 5 min	12 °C

Los productos de PCR fueron digeridos con DpnI, enzima que degrada DNA con marcas de metilación. Este tratamiento se realizó para eliminar el DNA molde proveniente de *E. coli* y que pudiera interferir con los pasos posteriores de transformación y selección de candidatas. Los componentes y condiciones de la reacción se describen en la **Tabla 12**.

Tabla 12: Componentes de reacción para la digestión enzimática de productos de PCR, volumen total 20 μ L. La reacción se incubó a 37 °C por 60 minutos y se inactivó a 80 °C por 20 minutos.

Reactivo	Volumen
Agua MilliQ	15 μ L
Amortiguador TANGO 10x (<i>Thermo Scientific</i>)	2 μ L
DNA (producto de PCR)	2 μ L
DpnI 10 U/ μ L (<i>Thermo Scientific</i>)	0.5 μ L

Ambos productos de PCR digeridos con DpnI fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.5 % y purificados con el *kit GeneJET Gel* de *Thermo Scientific*. Se utilizaron aproximadamente 500 ng de cada fragmento de PCR para transformar 1×10^8 células quimio-competentes de la cepa silvestre W3031A siguiendo el método de acetato de litio, PEG y DNA acarreador descrito por (Gietz & Schiestl, 2008). La mezcla de transformación utilizada se describe en la **Tabla 13**. El choque térmico se realizó a 42 °C por 90 minutos.

Tabla 13: Mezcla de transformación para el método de acetato de litio.

Reactivo	Volumen
PEG 3350 (50 % (w/v))	240 μ L
LiAc 1.0 M	36 μ L
DNA acarreador de cadena doble (dsDNA acarreador) 2 mg/ μ L	50 μ L
DNA pSAL4 (100 ng/ μ L)	5 μ L
DNA XYLEA (100 ng/ μ L)	5 μ L
TE 10x	36 μ L
DMSO	18 μ L
TOTAL	390 μ L

El volumen total de células transformadas fue concentrado a 100 μ L, sembrado en una caja Petri con medio YNBX₂₀ e incubado a 30 °C durante 5 días. Puesto que este medio de cultivo tiene 20 g/L de xilosa como única fuente de carbono y no contiene uracilo, solo las candidatas que lograrán incorporar la unidad transcripcional XYLEA dentro del vector podrán sobrevivir. El vector ensamblado fue nombrado pSCBXYLA (**Fig. 17**) y la cepa portadora se nombró W3031A [pSCBXYLA].

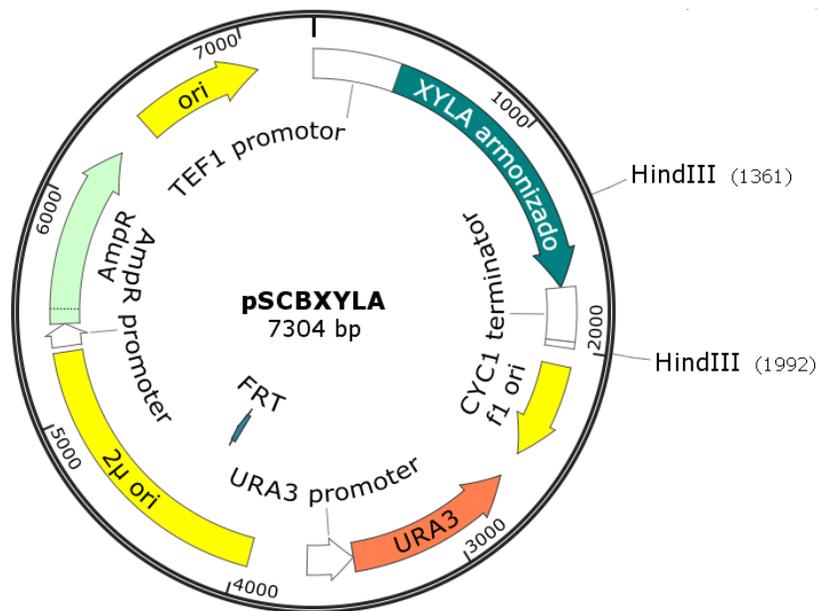


Figura 17: Plásmido pSCBXYLA generado por recombinación homóloga de pSAL4 y la unidad transcripcional XYL A. Puede replicarse en *E. coli* y en levaduras. Restaura auxotrofia a uracilo en cepas de *S. cerevisiae* URA3- y confiere capacidad de consumir xilosa por la vía de isomerización.

Se utilizó como control positivo de transformación 1 ng de pSAL4 para transformar 1×10^8 células quimio-competentes W3031A utilizando el mismo protocolo. El volumen total de células transformadas fue concentrado a 100 μ L. Fueron sembrados 10 μ L de este volumen en una caja Petri con medio YNBG₂₀ (glucosa 20 g/L); posteriormente fue incubada a 30 °C durante 2 días. Adicionalmente, 10 μ L fueron sembrados en una caja Petri con medio YNBX₅₀ e incubado a 30 °C durante 6 días. Este ensayo sirvió para confirmar que el vector pSAL4, del cual se partió para generar el vector pSCBXYLA, no confiriera por su cuenta la capacidad de consumir xilosa a la cepa tipo silvestre W3031A.

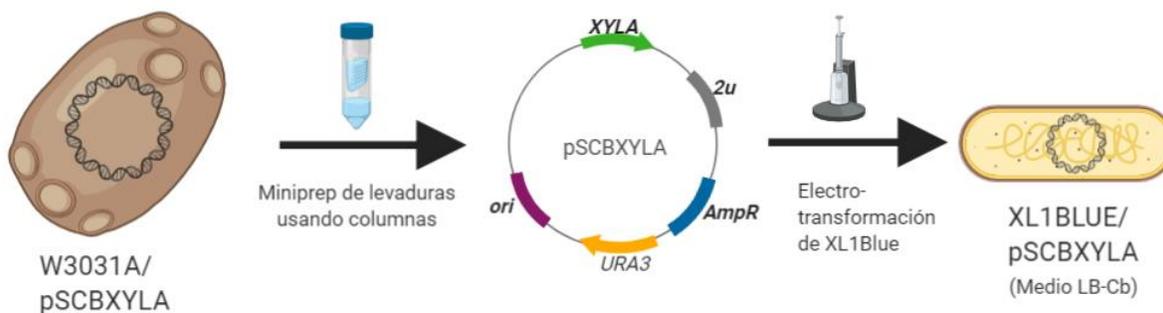


Figura 18: Estrategia para replicar pSCBXYLA en *E. coli* y poder confirmar la arquitectura molecular del plásmido.

Por el número de copias del plásmido pSCBXYLA y el rendimiento de la extracción de DNA plasmídico a partir de levaduras, fue necesario replicar el vector en bacterias para obtener la cantidad suficiente y realizar la comprobación de la arquitectura molecular del mismo (**Fig. 18**). Para esto, se extrajo DNA plasmídico de las cepas W3031A [pSCBXYLA] y W3031A [pSAL4] (como control de extracción de DNA) siguiendo el protocolo descrito en el **Apéndice E** y se concentró a 50 ng/ μ L en ambos casos. Se transformaron 1×10^8 células electro-competentes XL1Blue (*E. coli*) con el DNA plasmídico extraído de W3031A [pSCBXYLA] y W3031A [pSAL4] (control de transformación) siguiendo el protocolo descrito en el **Apéndice C**. El volumen total de células electro-transformadas fue concentrado a 100 μ L y sembrado en su totalidad en cajas Petri con medio sólido Lb-Cb. Lo anterior porque, tanto pSAL4 como el plásmido ensamblado pSCBXYLA tienen origen de replicación para bacterias y confieren resistencia a Ampicilina/Carbenicilina.

Tabla 14: Componentes de reacción para la digestión enzimática de pSCBXYLA y pSAL4 extraído de *E. coli*. Volumen total: 20 μ L. La reacción se incubó a 37 °C por 60 minutos y se inactivó a 80 °C por 20 minutos.

Reactivo	Volumen
Agua MilliQ	15 μ L
Amortiguador Red 10x (<i>Thermo Scientific</i>)	2 μ L
DNA (pSCBXYLA, pSAL4) 500 ng/ μ L	2 μ L
HindIII 10 U/ μ L (<i>Thermo Scientific</i>)	7.6 μ L

Se realizó una extracción de DNA plasmídico (*miniprep*) de tres colonias candidatas de la cepa XL1Blue[pSCBXYLA] y del control XL1Blue [pSAL4] siguiendo el protocolo del **Apéndice D**. El DNA plasmídico se concentró a 500 ng/ μ L y se utilizó para realizar una digestión enzimática con HindIII a las condiciones descritas en la **Tabla 14**. Los plásmidos digeridos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.5 % y visualizados utilizando el fotodocumentador

7.5.5 Generación de cepa termotolerante capaz de consumir xilosa.

Se generó una cepa termo tolerante que metabolice xilosa. Para esto se eliminó el gen *ERG3* de la cepa WSCB02. Una población de 1×10^8 células de esta cepa fue transformada con el vector pSCBXYLA previamente confirmado molecularmente siguiendo el método de acetato de litio (LiAc), PET y DNA acarreador descrito por (Gietz & Schiestl, 2008) (**Fig. 19**). La mezcla de transformación utilizada se describe en la **Tabla 15**. El choque térmico se realizó a 42 °C por 90 minutos. Se siguió el mismo protocolo con la cepa W3031A para generar una cepa silvestre con la capacidad de consumir xilosa y utilizarla como control en los experimentos posteriores. El volumen total de células transformadas fue concentrado a 100 μ L y sembrado en una caja Petri con medio sólido YNBX₅₀ para cada cepa e incubado a 30 °C durante 6 días.

Se utilizó como control positivo de transformación 1 ng de pSAL4 para transformar la cepa silvestre W3031A utilizando el mismo protocolo de transformación. El volumen total de células transformadas fue concentrado a 100 μ L y 10 μ L fueron sembrados en una caja Petri con medio sólido YNBG₂₀ para cada cepa e incubado a 30 °C durante 6 días.

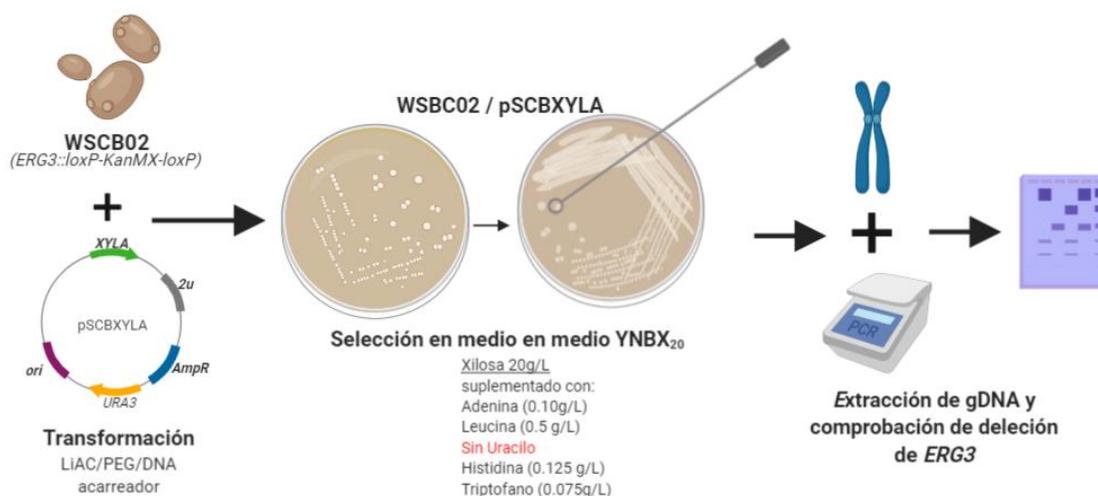


Figura 19: Estrategia para generar cepa termo tolerante con la capacidad de consumir xilosa.

Tabla 15: Mezcla de transformación para el método de acetato de litio.

Reactivo	Volumen
PEG 3350 (50 % (w/v))	240 µL
LiAc 1.0 M	36 µL
DNA acarreador de cadena doble (dsDNA acarreador) 2 mg/µL	50 µL
DNA (pSCBXYLA) (1 ng/µL)	10 µL
TE 10x	36 µL
DMSO	18 µL
TOTAL	390 µL

Se extrajo DNA genómico (gDNA) de WSCB02[pSCBXYLA] y del control de la transformación W3031A [pSCBXYLA] siguiendo el protocolo de (Lööke et al., 2017). El gDNA se concentró hasta 200 ng/µL. Se comprobó la sustitución de *ERG3* por el *casete* de resistencia *KanMX* flanqueado por sitios *loxP* en la cepa mutante y la presencia del gen nativo *ERG3* en la cepa silvestre por PCR utilizando los oligos 3 y 4 y las condiciones de reacción presentadas en la **Tabla 6**. El producto de PCR fue separado por electroforesis en gel de agarosa 0.5 % y visualizado para su análisis. Las cepas confirmadas molecularmente fueron crio-preservadas en crioviales con 40 % glicerol y 60 % medio DELFTX₂₀ con una concentración celular

de 0.9 g/L de peso seco de biomasa (1 OD₆₀₀) almacenados a -70 °C de ambas cepas.

7.6 Evaluación fisiológica de las cepas generadas

7.6.1 Evaluación del crecimiento utilizando xilosa como fuente de carbono.

La capacidad de crecimiento en medio mínimo usando xilosa como fuente de carbono principal se evaluó tanto de la cepa mutante WSCB02 [pSCBXYLA] (*ERG3::loxP-KanMX-loxP*), como de la cepa silvestre W3031A [pSCBXYLA]. Para esto se siguió la estrategia planteada en la **Fig. 20**.

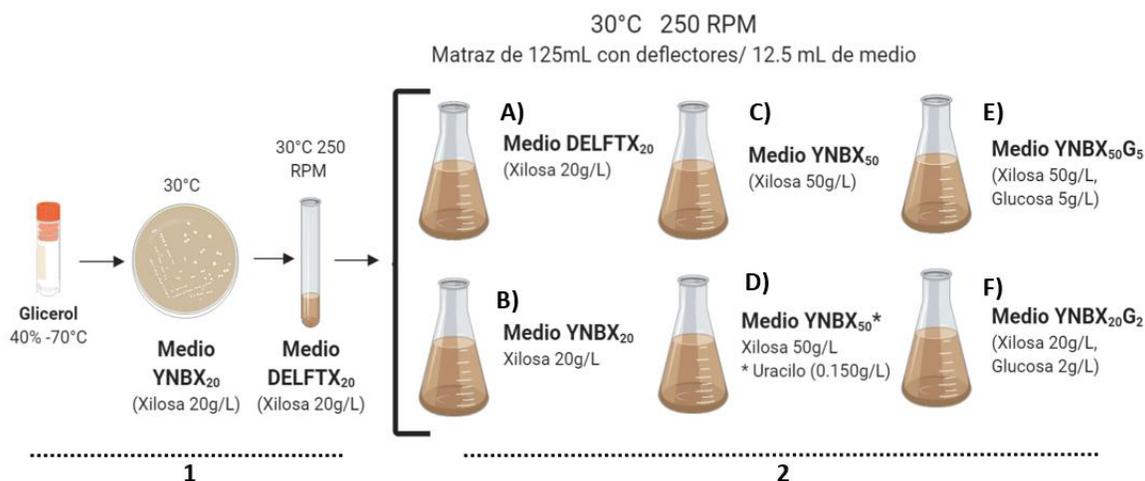


Figura 20: Estrategia diseñada para evaluar la capacidad de la cepa WSCB [pSCBXYLA] y W3031A [pSCBXYLA] de consumir xilosa como única fuente de carbono.

A partir de los crioviales de las cepas WSCB02 [pSCBXYLA] y W3031A [pSCBXYLA] se estriaron cajas Petri con medio sólido YNBX₂₀ y se incubaron a 30 °C durante 5 días. Después de este periodo, de las cajas incubadas se tomaron azadas para inocular tubos con medio líquido DELFTX₂₀ y se incubaron a 30 °C y 250 rpm por 5 días (**Fig. 20, 1**). Con los cultivos de los tubos se inocularon seis

matraces de 125 mL por cada cepa, cada uno con 12.5 mL de medio mínimo (**Fig. 20, 2 y Tabla 16**). Cuatro de estos con xilosa como única fuente de carbono y dos con xilosa y glucosa como fuentes de carbono.

Tabla 16: Medios utilizados para evaluar el crecimiento de las cepas generadas en el proyecto utilizando xilosa como fuente única de carbono.

Medio	Descripción
DELFTX ₂₀	Medio mínimo DELFT con 20 g/L Xilosa como fuente de carbono (Fig. 20, 2, A).
YNBX ₂₀	Medio mínimo YNB con 20 g/L Xilosa como fuente de carbono (Fig. 20, 2, B).
YNBX ₅₀	Medio mínimo YNB con 50 g/L Xilosa como fuente de carbono (Fig. 20, 2, C).
YNBX ₅₀ *	Medio mínimo YNB con 50 g/L Xilosa como fuente de carbono. Suplementado con 0.150 g/L de uracilo (Fig. 20, 2, D).
YNBX ₅₀ G ₅	Medio mínimo YNB con 50 g/L Xilosa y 5 g/L de Glucosa (Fig. 20, 2, E).
YNBX ₂₀ G ₂	Medio mínimo YNB con 20 g/L Xilosa y 2g/L de Glucosa (Fig. 20, 2, F).

La densidad celular de los seis cultivos fue monitoreada midiendo la absorbancia a 600 nm (OD₆₀₀), la cual sirvió para calcular la concentración de biomasa. La densidad celular inicial de todos los matraces fue de 0.2 OD₆₀₀.

7.6.2 Determinación de parámetros cinéticos del crecimiento en xilosa

Se evaluaron la velocidad específica de crecimiento, consumo de fuentes de carbono y producción de metabolitos de fermentación de la cepa mutante WSCB02 [pSCBXYLA] y silvestre W3031A [pSCBXYLA] siguiendo la estrategia mostrada en la **Fig. 21**. Para esto se diseñaron experimentos cuyo enfoque principal fue comprobar cuantitativamente la capacidad de estas cepas para consumir xilosa y

producir etanol, tanto en la temperatura óptima (30 °C), como en temperaturas elevadas (37 °C y 39 °C).

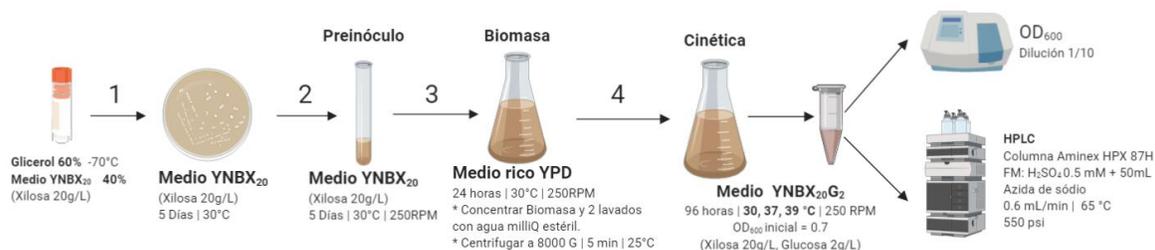


Figura 21: Estrategia para evaluar los parámetros cinéticos de las cepas generadas en el proyecto.

De forma paralela, tanto con la cepa WSCB02[pSCBXYLA] como con W30301A[pSCBXYLA] se realizó el siguiente procedimiento para realizar cultivos con elevada densidad celular (5 OD₆₀₀). A partir de cada glicerol de criopreservación se estrió una azada en cajas Petri independientes con medio sólido YNBX₂₀. Estas fueron incubadas a 30 °C durante 5 días (**Fig. 21, 1**). Con una colonia aislada de cada caja, se inocularon tubos de ensayo de 20 mL con 4 mL de medio líquido YNBX₂₀. Estos se incubaron a 30 °C y 250 rpm por 5 días (**Fig. 21, 2**). Posteriormente, los cultivos de estos tubos se utilizaron para inocular matraces de 500 mL con 50 mL de medio YPD (OD₆₀₀ inicial fue de 0.2). Éstos se incubaron a 30 °C y 250 rpm por 24 horas (**Fig. 21, 3**). El cultivo de estos matraces fue colectado en un tubo cónico de 50 mL estéril y centrifugado a 8000 G y temperatura ambiente por 5 min para concentrar la biomasa; se realizaron dos lavados con agua MilliQ estéril y la pastilla celular fue resuspendida en 5 mL. Esta biomasa concentrada y lavada se usó para inocular matraces de 500 mL con 50 mL de medio YNBX₂₀G₂, iniciando en 5 OD₆₀₀ y mantenidos a 30 °C y 250 rpm por 96 horas (**Fig. 21, 4**).

De cada matraz se colectaron 400 mL en los tiempos siguientes: 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h, 72 h y 96 h. 100 mL se usaron para medir la OD₆₀₀ en una dilución 1 a 10; y 100 mL se diluyeron 1 a 10 y fueron inyectados en el equipo de HPLC previo filtrado de la muestra con filtros de 0.2 µm.

Con los datos de OD_{600} , y los resultados obtenidos en el HPLC (concentración de xilosa, glucosa, glicerol, etanol y acético) se realizó la prueba Anderson-Darling para determinar si seguían una distribución normal. De ser así se aplicó una prueba T de student pareada, de lo contrario se aplicó una prueba Wilcoxon; en ambos casos, con el objetivo de determinar si existía diferencia estadística entre los cultivos de la cepa W3031A[pSCBXYLA] y WSCB02[pSCBXYLA]. Se utilizó un nivel de confianza de 95 %.

Para calcular el peso seco de biomasa (DCW) se utilizó la relación descrita en el apéndice F y la ecuación siguiente:

$$DCW = 0.8237OD_{600} + 0.1171$$

7.7 Evolución dirigida para mejorar el consumo de xilosa de cepas generadas.

La cepa mutante WSCB02[pSCBXYLA] y la cepa silvestre W3031A[pSCBXYLA] fueron sometidas a un proceso de evolución dirigida, o evolución adaptativa en laboratorio (ALE, por sus siglas en inglés), presentado en la **Fig. 22**.

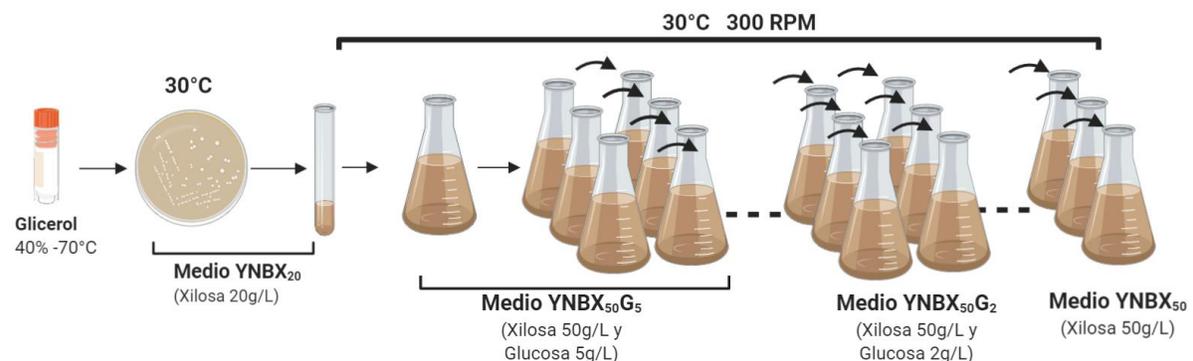


Figura 22: Estrategia de evolución dirigida enfocada en utilizar glucosa en concentraciones bajas en las primeras etapas del proceso y reducirla en dos etapas hasta llegar a solo tener xilosa como fuente de carbono.

El proceso de evolución se realizó de forma simultánea con la cepa mutante y silvestre con el plásmido pSCBXYLA. A partir de glicerol se estrió una caja Petri

con medio sólido YNBX₂₀ por cepa y ambas fueron incubadas a 30 °C durante 5 días. Se transfirió una colonia aislada de cada cepa a tubos de preinóculo independientes con medio líquido YNBX₂₀ y fueron incubados a 30 °C y 250 rpm por 5 días. Se inocularon tres matraces de 125 mL con 12.5 mL de medio YNBX₅₀G₅ (50 g/L de xilosa y 5 g/L de glucosa) por cepa para tener tres líneas independientes por cada cepa.

Se realizaron pases a medio fresco cada 48 horas por 20 generaciones. Posteriormente se realizaron pases a medio YNBX₅₀G₂ (50 g/L de xilosa y 2 g/L de glucosa), reduciendo en 3 g/L la concentración de glucosa manteniendo el proceso en esta condición por 35 generaciones, los pases fueron realizados a medio fresco cada 72 horas en promedio. Finalmente, los cultivos fueron transferidos a medio YNBX₅₀ (50 g/L de xilosa) El proceso de evolución dirigida fue monitoreado midiendo la OD₆₀₀ del cultivo cada 24 horas. Las seis cepas sometidas al proceso de evolución fueron crioreservadas en crioviales con 40 % glicerol y 60 % medio YNBX₂₀ con una concentración celular de 0.9 g/L de peso seco de biomasa (1 OD₆₀₀); se almacenaron a -70 °C. Los crioviales se etiquetaron con el nombre de la cepa de la que provienen y se les agregó el sufijo “EVO_#” siendo # un número entre 1 y 3.

8. RESULTADOS y DISCUSIÓN

8.1 Generación de la cepa termotolerante por sustitución del gene *ERG3* por la secuencia loxP-KanMX-loxP en la cepa W3031A

Se reemplazó el gen *ERG3* por la secuencia *loxP-KanMX-loxP*, que se compone de la unidad transcripcional *KanMX* (promotor *TEF1*, marco de lectura *KanMX* y terminador *TEF1*), flanqueada por dos sitios *LoxP* en sentido 5' – 3'. En este diseño, sólo las cepas que integrarán la secuencia *loxP-KanMX-loxP* a su

genoma podrán sobrevivir en el medio de selección, sin embargo, es probable que la integración fuera en un locus diferente al de *ERG3*. Esto se comprobó por PCR en cuatro candidatas seleccionadas al azar. Los resultados se muestran en la **Fig. 23**. La eficiencia de la transformación, definida en este caso como el número de unidades formadoras de colonias (cfu) obtenidas por la transformación de 1 μg de DNA en 1 μL de células quimio-competentes fue de 50 colonias/ $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ de DNA.

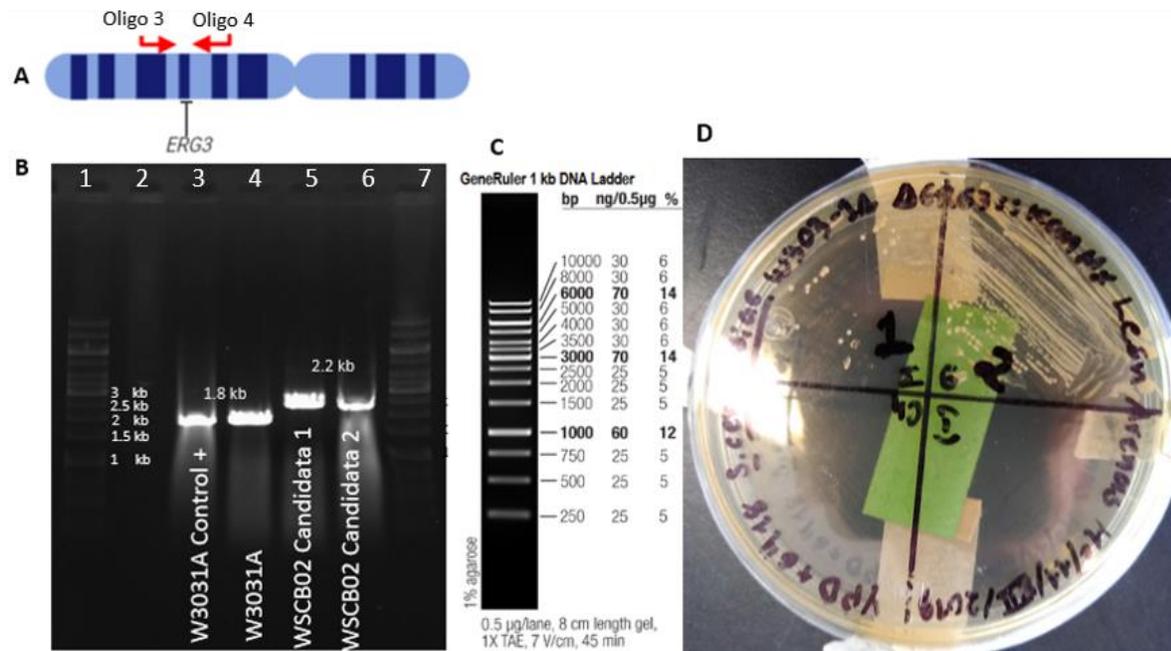


Figura 23: A) Diagrama que muestra la región en que los oligos 3 y 4 alinean. B) Productos de PCR de reacción para confirmar sustitución de *ERG3*. C) Patrón de bandas del marcador de peso molecular *GeneRuler* 1 kb de la marca *ThermoScientific* utilizado en todos los experimentos de este proyecto. D) Crecimiento de cepas transformadas en medio con antibiótico.

En los carriles 1 y 7 se cargó el marcador de peso molecular (**Fig. 23 B, C**). En el carril 3 se muestra el control positivo de la reacción, el cual es gDNA de la cepa W3031A. Este control prueba que la reacción con los oligos 3 y 4 amplificará un producto detectable bajo las condiciones utilizadas. El carril 4 corresponde a la reacción de PCR con el DNA de la cepa W3031A del control de la extracción. Con este ensayo se comprueba si la extracción de gDNA fue correcta y si el proceso de

concentración al vacío y la estimación posterior por *NanoDrop*. Ambos controles amplificaron un fragmento de aproximadamente 1.8 kb, correspondientes al resultado esperado (1826 pb) para la cepa silvestre. Los carriles 5 y 6 corresponden al resultado de dos candidatas WSCB02 positivas, en ambas se sustituyó el gen *ERG3* de 1099 pb por el producto de PCR *loxP-KanMX-loxP* de 1541 pb (**Fig. 23 B, D**) y presentan una banda de 2268 pb. Aunque en esta imagen se muestran sólo dos candidatas, las cuatro analizadas dieron el mismo resultado.

La cepa generada, WSCB02, contiene el marcador de *KanMX* flanqueado por sitios *loxP* en el mismo sentido que en el locus de *ERG3*. Esta condición permite utilizar en esta cepa el sistema de edición *Cre/loxP* proveniente del sistema de recombinación sitio-específica del fago P1 y se basa en el reconocimiento de la secuencia palindrómica de 34 pb *loxP* por la recombinasa *Cre* de este fago (Güldener et al., 1996). Con esta herramienta molecular es posible escindir la secuencia introducida y sustituirla por una cicatriz *loxP*, abriendo la posibilidad de utilizar nuevamente *KanMX* como marcador de selección tanto para deleciones como para inserciones cromosomales o de vectores no integrativos.

8.2 Diseño, construcción y clonación del gen de la xilosa isomerasa *XYLA* en *S. cerevisiae*

8.2.1 Obtención y armonización de *XYLA* para *S. cerevisiae*

La secuencia del gen *XYLA* (1669 pb) de *Piromyces* sp. *E2* se obtuvo de la base de datos GeneBank. Ésta se editó *in silico* para descartar las secuencias no codificantes. Para esto se eliminaron los primeros 4 pb correspondientes a la región 5' no traducida que incluía el residuo de metionina N-terminal. También se eliminaron los últimos 351 pb correspondientes a la región 3' no traducida, rica en AT, comúnmente encontrada en hongos aerobios. Estas secuencias fueron identificadas previamente por Kuyper et al., 2003. Se consideró como el marco de lectura del gen xilosa isomerasa (*XYLA*) sólo la secuencia restante de 1314 pb

(Apéndice A), el cual contiene los aminoácidos conservados en otras xilosa isomerasas asociados a la interacción con el sustrato (His 102, Asp 105, Asp 340 y Lys 235) y con cationes divalentes (Glu 232) (Kuyper et al., 2003)

Con la secuencia del marco de lectura *XYLA* se realizó la armonización de codones según lo descrito por (Angov et al., 2008). En este proceso se sustituyeron los codones del gen *XYLA* de *Piromyces sp. E2* por aquellos con la frecuencia de uso más cercana en *S. cerevisiae*. Este cambio permite que, en el organismo hospedero, la velocidad y, en consecuencia, la dinámica de traducción, sean más parecidas a la del organismo nativo. Lo que favorece el correcto plegamiento de la proteína heteróloga y evita la formación de cuerpos de inclusión.

Con el marco de lectura de *XYLA* armonizado para *S. cerevisiae* se realizó un *BLASTn* y un *BLASTX* en *NCBI*. La secuencia con mayor coincidencia de identidad de bases fue el mRNA del gen *XYLA* de *Piromyces sp. E2* (AJ249909.1) con un 88 % de identidad, sin embargo, la coincidencia fue de 99 % en cuanto a los aminoácidos traducidos a partir de esta secuencia (**Fig. 19**). Esto nos sugirió que, a pesar del cambio en la secuencia de nucleótidos tras el proceso de armonización, no se produjeron diferencias en los aminoácidos de la proteína esperada.

8.2.2 Construcción del vector pJET-XYLA para su clonación en *E. coli*.

La secuencia del marco de lectura de *XYLA* armonizada se utilizó para diseñar la unidad transcripcional *XYLA*. Este *casete* para clonación se integró con el promotor constitutivo fuerte del factor de elongación traslacional EF-1a, *TEF1*, el gen *XYLA* armonizado y el terminador de la isoforma 1 del citocromo c, *CYC1*. La selección del promotor y terminador se basó en su previa prueba y resultados en sistemas de expresión heteróloga en *S. cerevisiae* (Bai-Flagfeldt et al., 2009; Partow et al., 2010). Se agregaron sitios de corte de la enzima *XhoI* (5' CTCGAG 3') antes

del promotor y después del terminador para facilitar su futura manipulación. La secuencia completa fue sintetizada en un *Gene Block (gBlock)* por la empresa *Integrated DNA Technologies* IDT.

Sequence ID: Query_170405 Length: 1314 Number of Matches: 1

A [Range 1: 1 to 1313](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1567 bits(848)	0.0	1158/1313(88%)	0/1313(0%)	Plus/Plus

Chain A, Crystal structure of xylose isomerase from *Piromyces* sp. E2

B Sequence ID: [5YN3_A](#) Length: 449 Number of Matches: 1
[▶ See 3 more title\(s\)](#)

[Range 1: 13 to 449](#) [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
910 bits(2351)	0.0	Compositional matrix adjust.	436/437(99%)	437/437(100%)	0/437(0%)	+1

Figura 24: Resultado de BLASTn (A) y BLASTx (B) de la secuencia armonizada de XYLA en la base de datos de NCBI.

El gBlock de XYLA se clonó en un vector pJET1.2/Blunt, este sistema facilita la selección positiva de las colonias que contienen el inserto. En este vector, el sitio de clonación múltiple (MCS, por sus siglas en inglés) se encuentra en la secuencia del marco de lectura de un gen deletéreo para *E. coli* (*ECO471*), el cual se interrumpe al clonar los fragmentos de DNA. Esta acción interrumpe la traducción del producto tóxico de dicho gen y permiten la replicación de las bacterias en medio de selección. El tamaño de pJET es de 2974 bp y tiene un único sitio de corte de XhoI en el MCS. A su vez, el inserto de 1973 pb sólo cuenta con los sitios de corte de XhoI en los extremos 5' y 3' de la secuencia, los cuales se insertaron durante el diseño. Por este motivo la comprobación de la clonación se realizó mediante una digestión con XhoI a partir del DNA plasmídico extraído de la cepa XL1Blue transformada con la construcción pJETXYLA (**Fig. 25 A**).

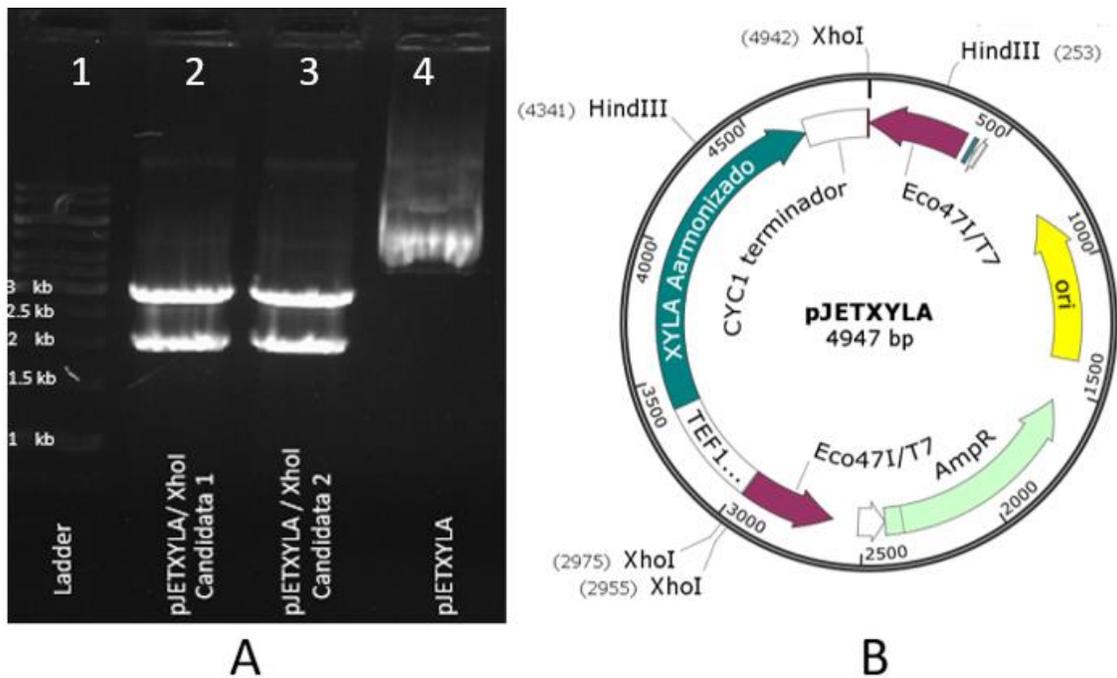


Figura 25: Comprobación de la arquitectura molecular del vector pJETXYLA (1µg) por digestión enzimática con XhoI. A) Gel de agarosa que muestra resultado de digestión. B) Diagrama del vector pJETXYLA resultante.

El carril 1 del gel muestra el marcador de peso molecular *GeneRuler* de 1kb con 14 bandas. Los carriles 2 y 3 muestran el resultado de las candidatas XL1Blue[pJETXYLA] 1 y 2 con el mismo patrón de bandas. La más pesada corresponde al DNA no digerido, posiblemente gDNA contaminante arrastrado durante la purificación en el *miniprep*. La siguiente banda con un tamaño aproximado de 5 kb corresponde al vector linealizado, cortado en un solo sitio por la enzima. La banda de aproximadamente 3 kb corresponde a la secuencia del pJET original (2974 pb). La banda de 2 kb es el inserto (1974 pb) escindido completamente por dos cortes en los sitios XhoI que lo flanquean. Finalmente, el carril 4 muestra el vector pJETXYLA de la candidata 1 sin digerir, el cual se utilizó como control para verificar el patrón de migración del vector no tratado y descartar que los patrones de bandas fueran resultado de una digestión deficiente o fuera el

plásmido superenrollado. La **Fig. 25, B** muestra el diagrama del vector pJETXYLA generado.

La eficiencia de la transformación de células electro-competentes XL1Blue con la construcción pJETXYLA, definida como el número de unidades formadoras de colonias (cfu) obtenidas por la electro-transformación de 1 µg de plásmido superenrollado en 1 µL de células electro-competentes, fue de 2×10^6 colonias/µL/µg de DNA.

8.2.3 Construcción del vector pSCBXYLA para su clonación en *S. cerevisiae*.

Para generar un vector de expresión con la unidad transcripcional de *XYLA* para *S. cerevisiae* se utilizó el protocolo de (van Leeuwen et al., 2015), con el que se ensambló un plásmido dentro de la levadura luego de transformarla con fragmentos lineales con extremos homólogos entre ellos y con características apropiadas para ser reconocidos por el complejo de reparación de DSBs, Rad52. Los fragmentos lineales en este caso son el vector pSAL4 y la unidad transcripcional *XYLA*. Ambos amplificados por PCR usando oligos con homología en sus extremos. Esta condición se ha descrito ampliamente como altamente recombinogénica (Ma et al., 1987). El extremo 5' de pSAL4 tiene homología con el extremo 3' de *XYLA*, el cual, a su vez, tiene homología en su extremo 5' con el extremo 3' de pSAL4.

Los productos de PCR se utilizaron directamente para transformar las células quimio-competentes W3031A por el diseño de la selección de candidatas positivas. Debido a que el medio utiliza xilosa como única fuente de carbono y no está suplementado con uracilo, solo las células que hayan integrado los dos fragmentos lineales tendrán un vector estable que pueda replicarse en *S. cerevisiae*. Es decir, por una parte, que pueda expresar la xilosa isomerasa y así completar la vía de consumo de xilosa y, por otra, que complete la auxotrofía a uracilo de la cepa con

la unidad transcripcional *URA3* (**Fig. 26**). La eficiencia de la transformación fue de 200 colonias/ $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ de DNA.

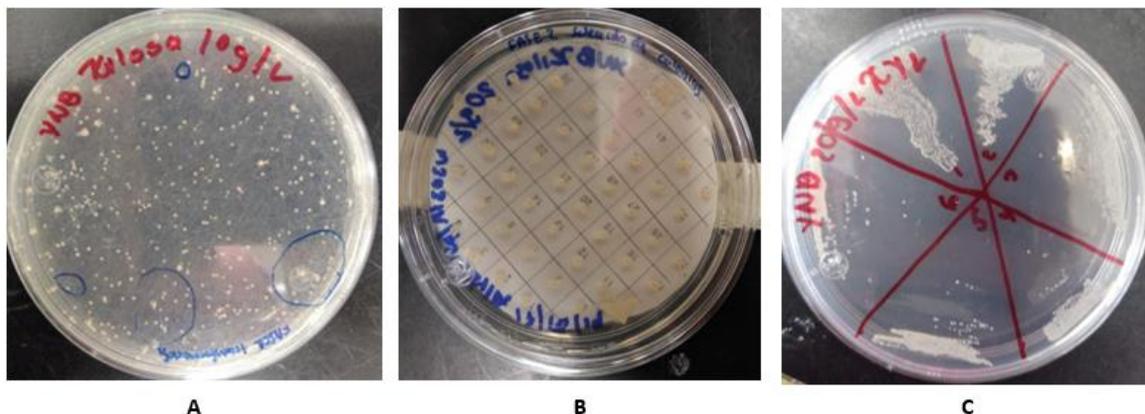


Figura 26: Selección de candidatas W3031A[pSCBXYLA] en medio YNBX₂₀, incubación a 30 °C durante 6 días. A) Células que crecieron después de la transformación con los fragmentos lineales pSAL4 y XYLA. B) Selección de 40 candidatas de la transformación, segundo pase realizado para descartar falsos positivos. C) Selección de 6 candidatas del segundo pase, tercer pase realizado para descartar falsos positivos.

Las cepas candidatas provenientes de la transformación fueron sometidas a dos pases secuenciales en medio de selección (**Fig. 26 B, C**). Esto porque, las células de *S. cerevisiae* cultivadas en medio rico YPD, pueden almacenar reservas que les permitan sobrevivir hasta 3 pases en medio sin algunos nutrientes como bases nitrogenadas. La cepa obtenida se nombró cepa W3031A[pSCBXYLA].

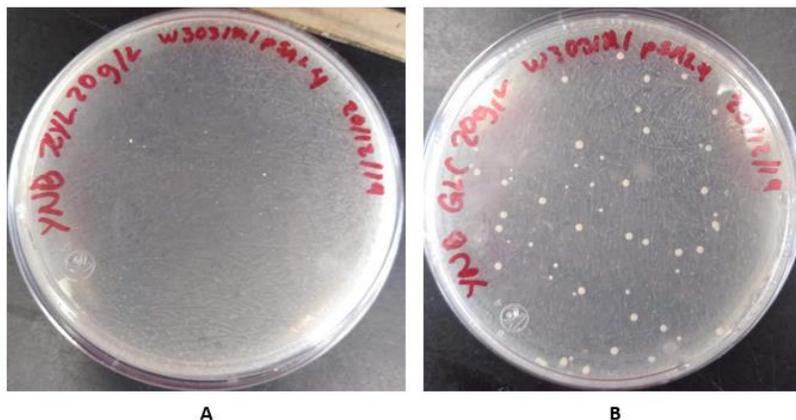


Figura 27: Cepa W3031A[pSAL4] en medio mínimo. A) Medio YNB₅₀, control que comprueba que pSAL4 no confiere capacidad de consumir xilosa. B) Medio YNBG₂₀, control de transformación.

También se transformaron células de W3031A con el vector pSAL4 vacío y se sembraron en medio sólido YNBG₂₀ (**Fig. 27 B**). Este experimento se utilizó para verificar que la técnica de transformación funcionara. Esto es, en caso de no haber candidatas en las cajas con la transformación W3031A[pSCBXYLA], poder descartar un problema con el seguimiento del protocolo de transformación. Las células también se sembraron en medio YNB₅₀ para confirmar que el vector por sí mismo no confiere la capacidad de consumir xilosa esta cepa (**Fig. 27 A**).

8.2.4 Comprobación de la arquitectura molecular del vector pSCBXYLA.

El vector pSCBXYLA resultante fue extraído de la cepa W3031A[pSCBXYLA] y purificado para su posterior replicación en *E. coli* y poder sintetizar 1 µg de DNA plasmídico. Esta cantidad se requería para realizar una comprobación de la arquitectura molecular por digestión enzimática. Para esto se utilizó HindIII, pues tanto pSAL4 como la unidad transcripcional XYLA tienen un sitio único de corte para esta enzima. El patrón de corte observado en la **Fig. 28** sirvió para comprobar la

clonación correcta del *XYLA* en el vector, lo cual se sugiere por la presencia de dos bandas y el sentido del inserto en la construcción.

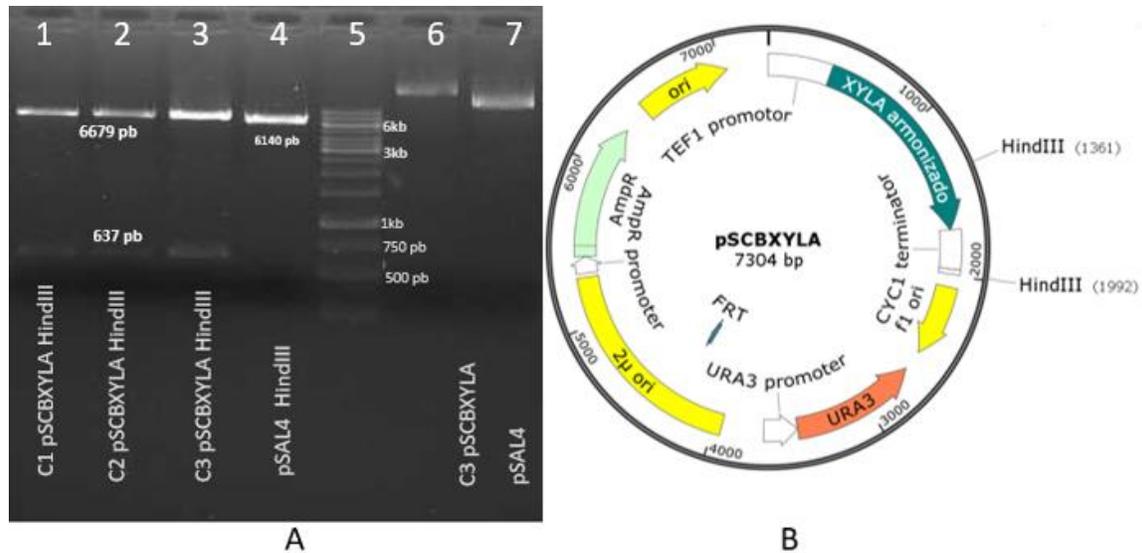


Figura 28: Comprobación de la arquitectura molecular del vector pSCBXYLA (1µg) por digestión enzimática con HindIII. A) Gel de agarosa que muestra resultado de digestión. B) Diagrama del vector pSCBXYLA resultante.

El carril 5 del del gel muestra el marcador de peso molecular (**Fig. 28 A**). Los carriles 1, 2 y 3 muestran la digestión del DNA plasmídico extraído de tres candidatas W3031A[pSCBXYLA]. Los tres presentan el mismo patrón de dos bandas: la más pesada se encuentra ligeramente arriba del indicador de 6 kb y corresponde al fragmento de 6679 pb; y la segunda banda corresponde al fragmento de 637 pb. Esta combinación indica que HindIII cortó en dos sitios, evidenciando que el inserto está presente en el plásmido de las tres candidatas (**Fig. 28 B**). Lo anterior se correlaciona con el patrón de bandas del vector vacío (pSAL4), pues éste sólo tiene un sitio XhoI y el tratamiento lo habría linealizado, como sucede con la presencia de una sola banda en el carril 4. Este corresponde al control de digestión cargado con 1 µg de pSAL4 digerido. Los carriles 6 y 7 fueron cargados con 1 µg de pSCBXYLA sin digerir de la candidata 3 y del control pSAL4 respectivamente. Eso nos sirvió para comprobar el patrón de migración de ambos vectores y descartar

que las bandas observadas derivaran de una digestión deficiente o del plásmido superenrollado.

8.2.5 Transformación de la cepa WSCB02 con el vector pSCBXYLA

La cepa termotolerante WSCB02 (*ERG3::loxP-XYLA-loxP*) obtenida por la eliminación del gen *ERG3* fue transformada con el vector de expresión de XYLA (pSCBXYLA). Para esto se utilizó la técnica de LiAc, PEG y DNA acarreador de Gietz et. al 2008. Como control se transformó a la cepa W3031A con el mismo vector. Este experimento también nos funcionó para comprobar que el plásmido construido puede volver a conferir la capacidad de consumir xilosa y restablecer la auxotrofia a uracilo de la cepa silvestre.

Las poblaciones de WSCB02 y W3031A transformadas con el plásmido pSCBXYLA fueron sembradas en medio de selección YNBX₂₀ y sometidas a dos pases en el mismo medio para descartar que el crecimiento fuera producto del consumo de nutrientes de reserva. Las poblaciones de células transformadas se muestran en la **Fig. 29, A**. La eficiencia de la transformación fue de 1×10^3 colonias/ $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ de DNA. El primer pase de todas las candidatas se muestra en la **Fig. 29, B** y el segundo de la candidata 1 **Fig. 29, C**.

Las candidatas WSCB02 [pSCBXYLA] presentan un fenotipo *petite*, posiblemente conferido por la deleción de *ERG3*. La eliminación de este gen altera el metabolismo de esteroides el cual está relacionado a la síntesis de ubiquinonas. Estudios previos demostraron que esta deleción produce células con deficiencias en el metabolismo respiratorio y, por lo tanto, incapaces de utilizar fuentes de carbono no fermentables (Caspeta et al., 2014; Smith & Parks, 1993). A esto se suma la carga metabólica que el plásmido pone sobre las células, así como la dificultad de crecer con xilosa como fuente única de carbono. En el control de la cepa silvestre también se observa una reducción en el tamaño de las colonias. Sin

embargo, estas se definen a partir de la hora 72 de incubación, en comparación con las mutantes en *ERG3* que lo hacen hasta el cuarto día.

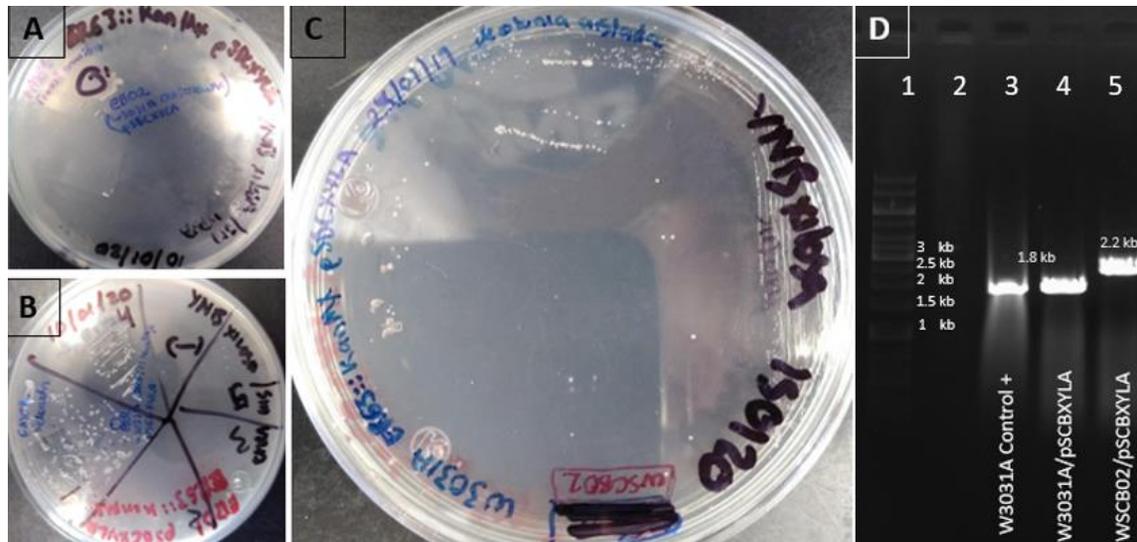


Figura 29: Transformación de cepa WSCB02 con pSCBXYLA y comprobación de la sustitución *ERG3::loxP-XYLA-loxP*. A) Colonias resultantes de la transformación. B) Primer pase de cuatro candidatas. C) Segundo pase de candidata 1. D) Gel de agarosa que muestra resultado de PCR con gDNA de la cepa WSCB02 [pSCBXYLA] en carril 4 y del control W3031A[pSCBXYLA] en carril 3.

Se extrajo gDNA de la candidata 1 de WSCB02[pSCBXYLA] y del control W3031A[pSCBXYLA]. Con éste se realizó una reacción de PCR para comprobar la sustitución del gen *ERG3* en la mutante (la misma realizada anteriormente con los oligos 3 y 4). El gel de agarosa en el que se separaron y visualizaron los fragmentos obtenidos se muestra en la **Fig. 29, D**. El primer carril del gel contiene el marcador de peso molecular. El segundo carril está vacío y el tercero corresponde al control de la reacción, el cual en el gDNA la cepa silvestre W3031A previamente extraído y comprobado. El ensayo anterior permitió comprobar que la reacción de PCR realizada funcionara correctamente con las condiciones utilizadas. El carril 4 corresponde a la cepa W3031A[pSCBXYLA]. La banda obtenida es del mismo tamaño que la del control de la reacción (1826 pb), el cual corresponde al tamaño de *ERG3* (1099), más 222 pb río arriba y 505 pb río abajo (posiciones en dónde se

alinean los oligos 3 y 4). El carril 5 corresponde a la cepa WSCB02[pSCBXYLA] y presenta una banda de 2268 pb que coincide con el tamaño esperado de la sustitución *ERG3::loxP-KanMX::loxP* (1541 pb) más las bases amplificadas por la posición en la que alinean los oligos.

8.3 Evaluación del crecimiento de WSCB02[pSCBXYLA] y W3031A [pSCBXYLA] con xilosa a 30 °C.

En los experimentos descritos en el apartado anterior se comprobó que las cepas mutantes WSCB02 y silvestre W3031A, con el plásmido pSCBXYLA pueden crecer en medio mínimo sólido YNBX₂₀ consumiendo xilosa como fuente de carbono. Posteriormente se demostró que ambas pueden crecer en tubos con medio mínimo líquido DELFTX₂₀ con 20 g/L de xilosa como única fuente de carbono. En esta condición, la cepa silvestre alcanzó una densidad celular (medida en densidad óptica) de 2.26 OD_{600nm} y la mutante 0.54 OD_{600nm}, después de 72 horas de cultivo a 30 °C y 250 rpm (**Fig. 20, 1**). También se comprobó que ambas pueden criopreservarse a -70 °C en crioviales con 40 % glicerol y a partir de ellos volver a generar colonias en medio sólido YNBX₂₀ (**Fig. 20, 1**).

No obstante, de que se observó crecimiento de las cepas modificadas en xilosa (medio DELFTX₂₀), al escalar los cultivos a matraces de 125mL, iniciando a 0.1 OD₆₀₀ encontramos que la cepa silvestre alcanzó 2.25 OD₆₀₀ a las 48 horas, pero no hubo crecimiento detectable en el matraz de la cepa mutante, incluso después de 5 días (**Fig. 20, 2, A**). Para descartar que la biomasa inicial y su proporción de células viables en el matraz de adaptación estuviera limitando el crecimiento en el caso de la mutante, se repitió el experimento iniciando con 0.3 OD₆₀₀ obteniendo el mismo resultado.

La xilosa isomerasa utiliza metales divalentes como cofactores, principalmente Mn²⁺ (Lee et al., 2017). En el medio DELFTX₅₀, la fuente de estos cofactores es la solución de elementos traza y el sulfato de magnesio. Para descartar que una posible degradación de la solución de elementos traza provocara

una reducción en la disponibilidad de cofactores divalentes; el cultivo en matraz se repitió usando medio mínimo YNBX₂₀ (*Difco Yeast Nitrogen Base*) recién preparado (**Fig. 20, 2, B**). Nuevamente no se detectó crecimiento en matraz de la cepa mutante después de 5 días y la cepa silvestre alcanzó un valor promedio de 2.3 OD₆₀₀ tras 48 horas de cultivo.

S. cerevisiae no posee transportadores especializados de pentosas, en consecuencia, la xilosa es internalizada por difusión facilitada a través de las permeasas de hexosas de la familia HXT (1-7) con una afinidad 100 veces menor que para glucosa (Reifenberger et al., 1995). Estos transportadores aumentan su expresión de 10 a 300 veces en presencia de concentraciones superiores a 0.05 % (w/w) de glucosa en el medio, pues su papel principal es la internalización rápida de hexosas en concentraciones elevadas (Johnston, 1995). En medio con xilosa como única fuente de carbono, la expresión de estos transportadores debe ser al menos 10 veces menor que en medio con glucosa (Johnston, 1995). Buscando favorecer el ingreso de la xilosa al citoplasma aumentando la diferencia de concentraciones extra e intracelular, el cultivo en matraz se realizó en medio YNBX₅₀ (50 g/L de xilosa) en el paso 3 de la estrategia planteada (matraz de adaptación). En promedio, la cepa mutante en *ERG3* aumentó 0.15 unidades de OD₆₀₀ después de 5 días; la cepa silvestre alcanzó un valor promedio de 2.4 OD₆₀₀ en la hora 48 (**Fig. 20, 2, C**).

La xilosa se incorpora al metabolismo central por la vía no oxidativa de las pentosas fosfato (no-PPP) y se integra en una proporción de 2 a 1 como Fructuosa-5-fosfato y gliceraldehido-3-fosfato en la vía glucolítica (Wasylenko & Stephanopoulos, 2015). Por su parte, el uracilo es sintetizado a partir de precursores provenientes de esta vía como el 5-fosfo- α -D-ribosa-1-difosfato (PRPP) (derivado de la D-ribosa 5-fosfato). Por otro lado, se ha comprobado que una delección en *ERG3* impide a *S. cerevisiae* el consumo de fuentes de carbono no fermentables (Smith & Parks, 1994); lo que supone una deficiencia en el metabolismo respiratorio de las mutantes *ERG3*. Esta condición podría provocar una menor capacidad de obtener energía y precursores biosintéticos por el ciclo de Krebs (TCA, por sus

siglas en inglés) y la cadena transportadora de electrones. Una de las explicaciones posibles para la incapacidad de duplicarse de la mutante WSCB02 en medio mínimo consumiendo xilosa es que exista una competencia por el carbono entre las vías productoras de energía y aquellas que proveen de precursores para la síntesis del uracilo, sumado a la menor capacidad de obtener ATP y cofactores reducidos por el TCA. Por este motivo se repitió el cultivo en matraz adicionando 0.15 g/L de uracilo al medio YNBX₅₀ (Pronk, 2002). En este ensayo, la cepa silvestre alcanzó una OD₆₀₀ de 2.2 a las 48 horas, mientras la cepa silvestre después de 5 días no mostró crecimiento detectable (**Fig. 20, 2, D**).

Tras haber evaluado el efecto de la densidad celular inicial, distintos medios mínimos, diferentes concentraciones de y la adición de uracilo en el medio, lo siguiente fue evaluar cultivos con glucosa y xilosa simultáneamente adicionados al medio de cultivo.

Se ha reportado que las cepas de *S. cerevisiae* modificadas para metabolizar xilosa crecen si se les adiciona una concentración inicial pequeña de glucosa (Gonçalves et al., 2014). Dado lo anterior se decidió evaluar el crecimiento en cultivos en matraz con medio YNBX₅₀G₅ (50 g/L de xilosa y 5 g/L de glucosa) (**Fig. 20, 2, E**). La glucosa fue adicionada al medio para favorecer las primeras duplicaciones y que se promoviera la expresión de la familia de transportadores HXT, así como para que se promoviera la síntesis de metabolitos de la vía oxidativa de pentosas fosfato. Después de 48 horas de cultivo en matraz, la cepa silvestre alcanzó 3.6 y la mutante 2.7 OD₆₀₀, partiendo en ambos casos de 0.1 OD₆₀₀. Estos valores indicaban que la cepa silvestre se duplicó 5.1 y la mutante 4.8 veces. Para la cepa W3031A el rendimiento de peso seco de biomasa (DCW) por gramo de glucosa es de 0.12 y 1 OD₆₀₀ corresponde a 0.9 gDCW. El incremento en la densidad óptica (OD₆₀₀) habiendo consumido toda la glucosa del medio debe ser de 0.54 unidades (0.6 gDCW). Que ambas cepas presentaran un aumento mayor en la densidad óptica supone que están consumiendo xilosa. Este resultado supone que

una concentración baja de glucosa puede favorecer el crecimiento a partir de xilosa una vez que la glucosa ha sido agotada.

8.4 Evolución dirigida de cepas WSCB02[pSCBXYLA] y W3031A [pSCBXYLA].

Se optó por una estrategia de evolución dirigida para mejorar la capacidad de consumo de xilosa de ambas cepas. Para este fin se partió de cultivos con medio YNBX₅₀G₅ (OD₆₀₀ inicial de 0.1) a 30°C y se redujo la concentración de glucosa primero a 2g/L (medio YNBX₅₀G₂) y finalmente se eliminó para tener únicamente xilosa como fuente de carbono (medio YNBX₅₀) (**Fig. 22, Fig. 30**). En breve, tres poblaciones (P1, P2, P3) de ambas cepas fueron cultivadas en medio YNBX₅₀G₅ por 20 generaciones. Después en medio YNBX₅₀G₂ donde la concentración de glucosa se redujo a 2 g/L y las cepas se mantuvieron durante 39 generaciones más. En los primeros pases en YNBX₅₀G₂, la densidad celular alcanzada a las 48 horas fue de 0.72 y 0.63 OD₆₀₀ para la cepa silvestre y mutante respectivamente, pero en el último pase estos valores fueron de 2.39 (4.5 duplicaciones) y 1.86 (4.2 duplicaciones). Lo que sugiere que ambas cepas adoptaron su metabolismo para consumir xilosa más eficientemente.

Finalmente se realizó un pase a medio YNBX₅₀, el cual contenía sólo 50 g/L de xilosa. La cepa silvestre W3031A [pSCBXYLA] se mantuvo por 5 generaciones, sin embargo, la cepa mutante WSCB02[pSCBXYLA] no presentó crecimiento después de 5 días en el primer pase.

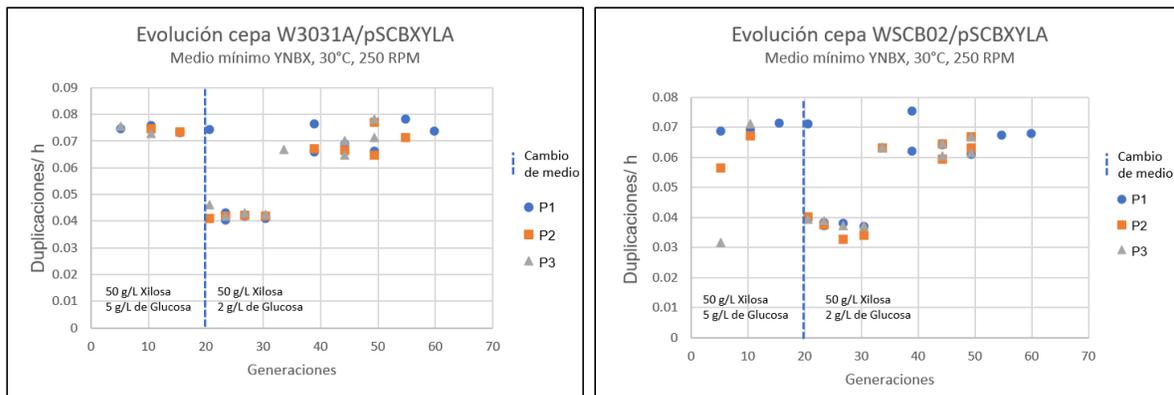


Figura 30: Evolución de cepas W3031A [pSCBXYLA] y WSCB [pSCBXYLA] en medio con xilosa y glucosa.

A principios de la década pasada (Wasylenko & Stephanopoulos, 2015; Zhou et al., 2012), se caracterizó el metabolismo de xilosa mediante análisis de flujos metabólicos en una cepa de *S. cerevisiae* consumidora de xilosa por la vía de la isomerización. Observaron que cuando la cepa crece en xilosa comparado con glucosa (con oxígeno), el flujo de piruvato citosólico a la mitocondria es tres veces mayor, y el de las primeras reacciones del ciclo de Krebs (TCA) es, en promedio, 1.3 veces mayor. Por otro lado, Zhou et al. 2012 y Jin, et. al 2004 demostraron que la expresión de los genes del TCA, de enzimas involucradas en el metabolismo respiratorio (*HXK1*, *ADH2*, *COX13*, *NDI1*, y *NDE1*), y de los reguladores transcripcionales *HAP4* y *MTH1* (encargados de activar el metabolismo de fuentes de carbono no fermentables y reprimir la vía de detención de glucosa) aumentaron durante el consumo de xilosa con respecto a condiciones de consumo de glucosa. Estos resultados sugieren que *S. cerevisiae* no reconoce la xilosa como una fuente de carbono fermentable y demanda mayor uso de las vías catabólicas respiratorias.

Se ha comprobado que las mutantes *ERG3* no pueden crecer en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono en condiciones de anaerobiosis, a menos que el medio se suplemente con 0.01g/L de ergosterol (Smith & Parks, 1994). La razón principal es que la síntesis de esteroides es totalmente dependiente de oxígeno. No obstante, estas mutantes tampoco pueden crecer en fuentes de

carbono respirativas como el etanol incluso en presencia de oxígeno. La explicación fisiológica de este fenómeno no se conoce con certeza, sin embargo, es probable que se deba a un proceso de regulación. Se ha propuesto que los esteroides funcionan como sensores de oxígeno en distintos organismos. En *Schizosaccharomyces pombe*, el factor de transcripción Sre1, análogo a *Srpb* en humanos, se expresa en condiciones de agotamiento de esteroides y activa la regulación negativa de los pasos finales de la vía de síntesis de esteroides, dependientes de O₂ (Hughes et al., 2005). En células animales, la limitación de oxígeno genera acumulación de lanosterol y dihidrolanosterol, intermediarios dependientes de O₂ para la síntesis de colesterol, que promueven la degradación de la HMG-CoA reductasa que se traduce en cortar el flujo de carbono en la síntesis de esteroides y en activar vías de señalización de hipoxia (DeBose-Boyd, 2008).

En *S. cerevisiae* no se encuentra *SRE1* ni otro análogo *SRPB*, sin embargo, existe evidencia de que el agotamiento de la poza de esteroides es responsable de la respuesta de hipoxia a partir de los factores de transcripción UPC2p y Ecm22p (Davies & Rine, 2006; Galea & Brown, 2009).

La evidencia recopilada en este trabajo revela que la mutante WSCB02 [pSCBXYLA] (*ERG3::loxP-KanMX-loxP*) no es capaz de crecer en medio mínimo con xilosa como única fuente de carbono, sin embargo, es capaz de crecer en medio con glucosa y xilosa en proporciones 1 a 10 y consumir este último carbohidrato. La información presentada en los tres párrafos anteriores sugiere que este resultado se debe a que la xilosa es detectada como una fuente de carbono no fermentable que requiere ser oxidada por la vía respirativa; y la pérdida de *ERG3* interfiere con el uso estas vías.

8.4.1 Cinéticas de cultivo de las cepas WSCB02 [pSCBXYLA] y W3031A [pSCBXYLA] en xilosa a 30 °C, 37 °C y 39 °C

Para evaluar el crecimiento en xilosa de las cepas WSCB02 y W3031A transformadas con el plásmido pSCBXYLA, se recurrió a cultivos con 20 g/L de este azúcar y 2 g/L de glucosa, donde se probó que pueden crecer. Lo anterior para evaluar el crecimiento de la cepa mutante $\Delta ERG3$, ya que esta no crece en xilosa como única fuente de carbono.

En la **Fig. 31** se muestran los perfiles de consumo de xilosa y glucosa, y de síntesis de biomasa y etanol de la cepa W3031A [pSCBXYLA] cultivada a 30 °C. A lo largo de 96 horas de cultivo, esta cepa consumió xilosa, disminuyendo su concentración de 20 g/L a 15.5 g/L, en promedio. El consumo de xilosa se observó después de 6-8 h, cuando la glucosa y el etanol se agotaron. La glucosa se consumió durante la primera hora, tiempo en el que se acumuló menos de 0.5 g/L de etanol, el cual se consumió rápidamente. Después de 2 h de cultivo, las células sólo podían consumir xilosa. Esta se consumió lentamente durante cerca de 90 h. tiempo en el cual no se observó crecimiento, pues la OD_{600} pasó de ~6.5 a ~6.7. Entre los cinco cultivos utilizados para determinar el promedio y desviación estándar de cada punto se observa una importante variación. Esto ocurrió en todas las cinéticas y sugiere que el metabolismo de xilosa provoca un fuerte desajuste metabólico que impide la acumulación de biomasa. Lo anterior implica que la xilosa consumida podría estar siendo utilizada para el mantenimiento celular. Dado lo anterior, no se pudieron calcular parámetros cinéticos en estos cultivos, y sólo se presentan los perfiles de consumo de xilosa.

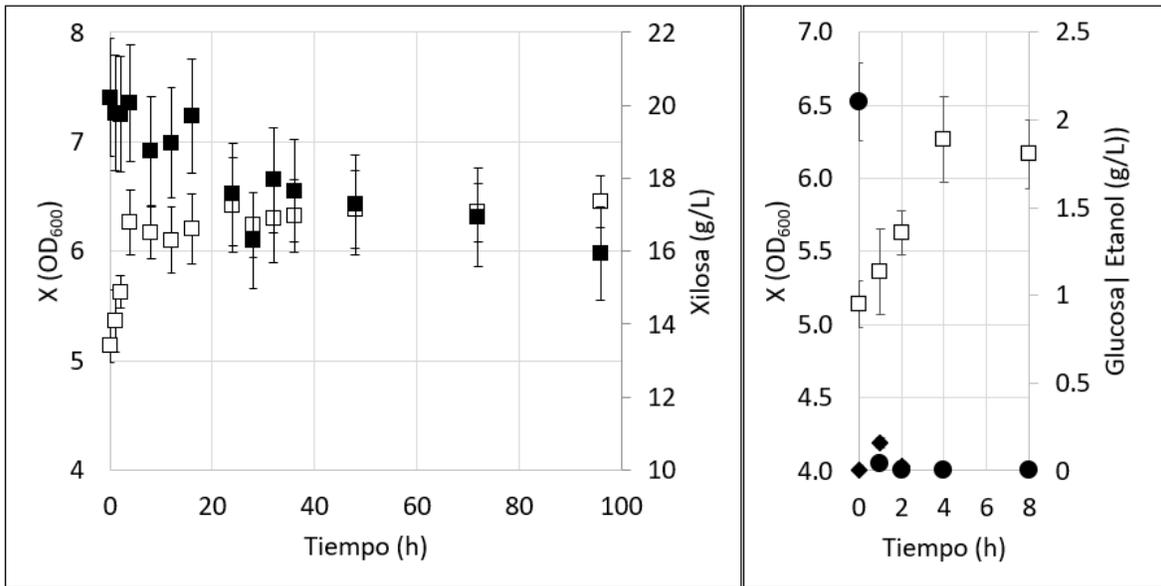


Figura 31: Cinéticas de crecimiento (\square), consumo de glucosa (\bullet) y xilosa (\blacksquare), y producción de etanol (\blacklozenge) de la cepa silvestre W3031A transformada con el plásmido pSCBXYLA, cultivada a 30 °C y 250 rpm durante 96 horas en medio YNBX₂₀G₂.

En la **Fig. 32** se muestran los parámetros del cultivo de la cepa mutante carente del gen *ERG3* (Δ *ERG3*), la WSCB02 [pSCBXYLA]. Se puede observar que, al igual que con la cepa silvestre, la cepa mutante Δ *ERG3* consumió rápidamente la glucosa y el etanol en las primeras dos horas. Sin embargo, esta cepa, consume la xilosa con mucha dificultad.

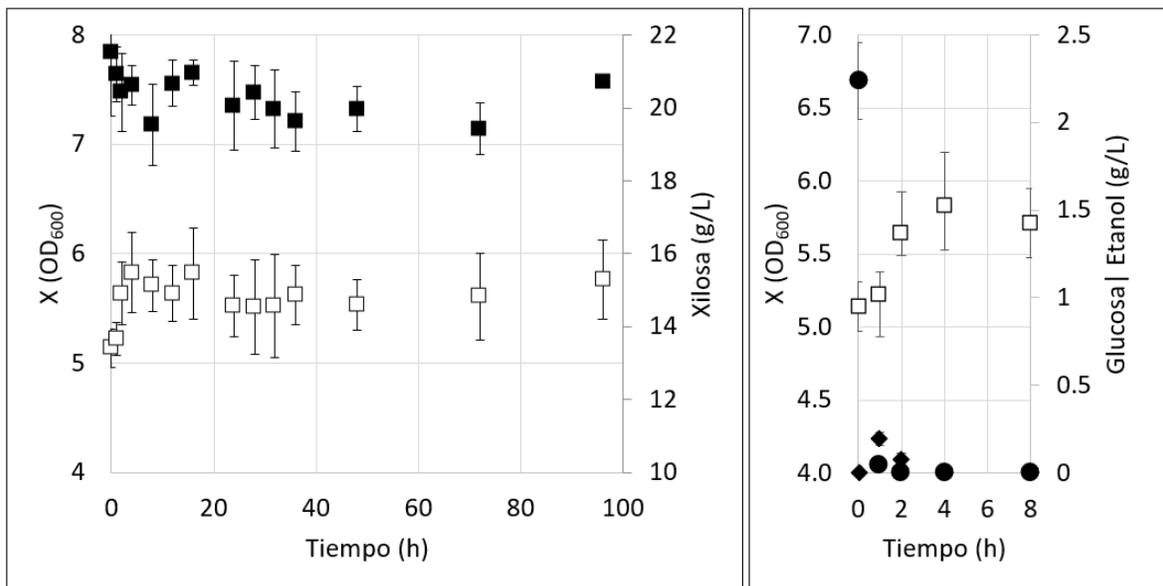


Figura 32: Cinéticas de crecimiento (□), consumo de glucosa (●) y xilosa (■), y producción de etanol (◆) de la cepa mutante WSCB02 transformada con el plásmido pSCBXYLA, cultivada a 30 °C y 250 rpm durante 96 horas en medio YNBX₂₀G₂.

Se evaluó el crecimiento de la cepa W3031A [pSCBXYLA] a 37 °C. Los resultados de los perfiles cinéticos de crecimiento y consumo de xilosa se muestran en la **Fig. 33**. En esta temperatura, la cepa W3031A transformada con el plásmido pSCBXYLA mostró un mayor consumo de xilosa, ya que ésta paso de 21 g/L a 13 g/L, en promedio. La biomasa incremento de 5 a 7 OD₆₀₀. Al igual que en los cultivos a 30 °C, el consumo de glucosa y etanol ocurrieron en las primeras dos horas. Aun cuando se redujo la concentración de xilosa en 8 g/L, el crecimiento fue de 1.5 OD₆₀₀ aproximadamente, lo cual no refleja el consumo de la xilosa. Esto sugiere que la mayor parte de la xilosa consumida se utiliza para mantenimiento.

Comparado con 30 °C, a 37 °C el consumo de xilosa fue el doble, aunque no se observó producción de etanol. Lo anterior sugiere que la xilosa está siendo metabolizada por la vía respiratoria. Sorprendentemente, mientras el consumo de glucosa incrementa a elevada temperatura y su metabolismo es básicamente fermentativo, el consumo de xilosa incrementa, pero sigue un metabolismo respiratorio.

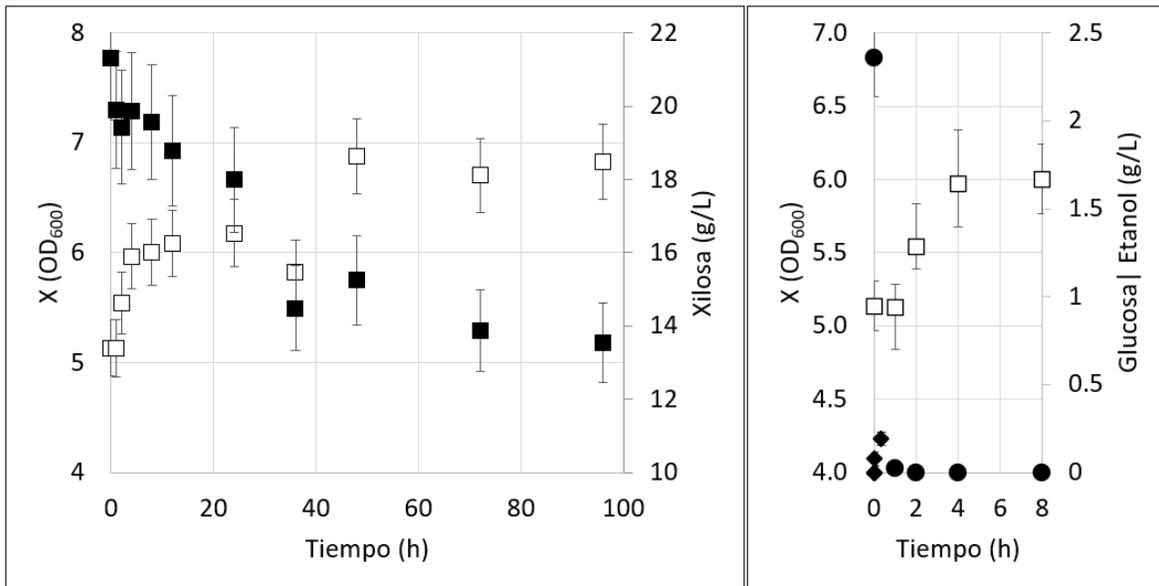


Figura 33: Cinéticas de crecimiento (□), consumo de glucosa (●) y xilosa (■), y producción de etanol (◆) de la cepa silvestre W3031A transformada con el plásmido pSCBXYLA, cultivada a 37 °C y 250 rpm durante 96 horas en medio YNBX₂₀G₂.

El hecho de que la cepa silvestre con el plásmido consume mejor la xilosa mediante la vía oxidativa hasta la cadena de transporte de electrones sugeriría entonces que la cepa con la mutación en *ERG3* no podría consumir bien xilosa aún en presencia de oxígeno, pues esta cepa presenta deficiencias para utilizar esta vía. La **Fig. 34** muestra que la cepa WSCB02[pSCBXYLA] tampoco consume bien la xilosa a 37 °C. Sin embargo, comparado con los resultados a 30 °C, el consumo de xilosa es un poco mayor puesto que al final de las 96 horas quedaban alrededor de 17.5 g/L. Este consumo es tan sólo el 25 % del consumo observado en la cepa silvestre. Si bien la cepa Δ *ERG3* resiste mejor la temperatura cuando se cultiva en glucosa, ésta no es eficiente a elevada temperatura dado que el consumo de xilosa parece realizarse por la vía oxidativa.

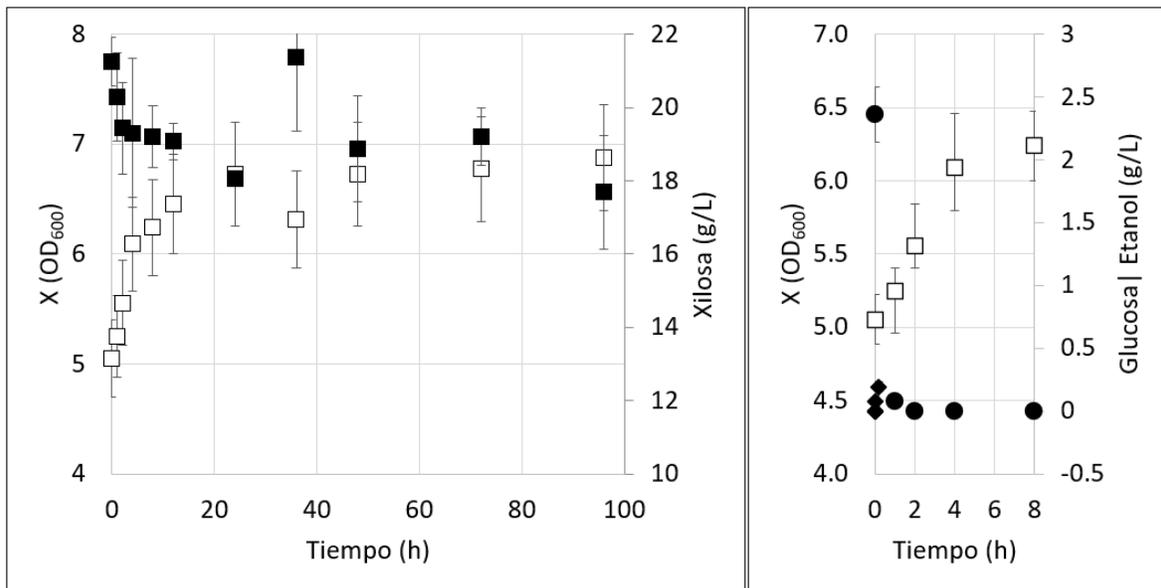


Figura 34: Cinéticas de crecimiento (□), consumo de glucosa (●) y xilosa (■), y producción de etanol (◆) de la cepa mutante WSCB02 transformada con el plásmido pSCBXYLA, cultivada a 37 °C y 250 rpm durante 96 horas en medio YNBX₂₀G₂.

En las **figuras 35** y **36** se muestran los resultados del cultivo de las cepas W3031A y WSCB02 con el plásmido pSCBXYLA a 39 °C. Se puede observar que ninguna mostró un consumo claro de xilosa en esta temperatura, aunque ambas consumieron la glucosa y el etanol en las primeras dos horas de cultivo. A esta temperatura se ha demostrado que *S. cerevisiae* típicamente pierde su capacidad para utilizar la cadena de transporte de electrones. Esta situación, además de generar cepas incapaces de metabolizar carbohidratos por la vía respiratoria, disminuye su esperanza de vida debido a que genera fragmentación de la vacuola y la mitocondria, conduciendo esto a una muerte celular temprana, comparado con el crecimiento de la cepa a menor temperatura.

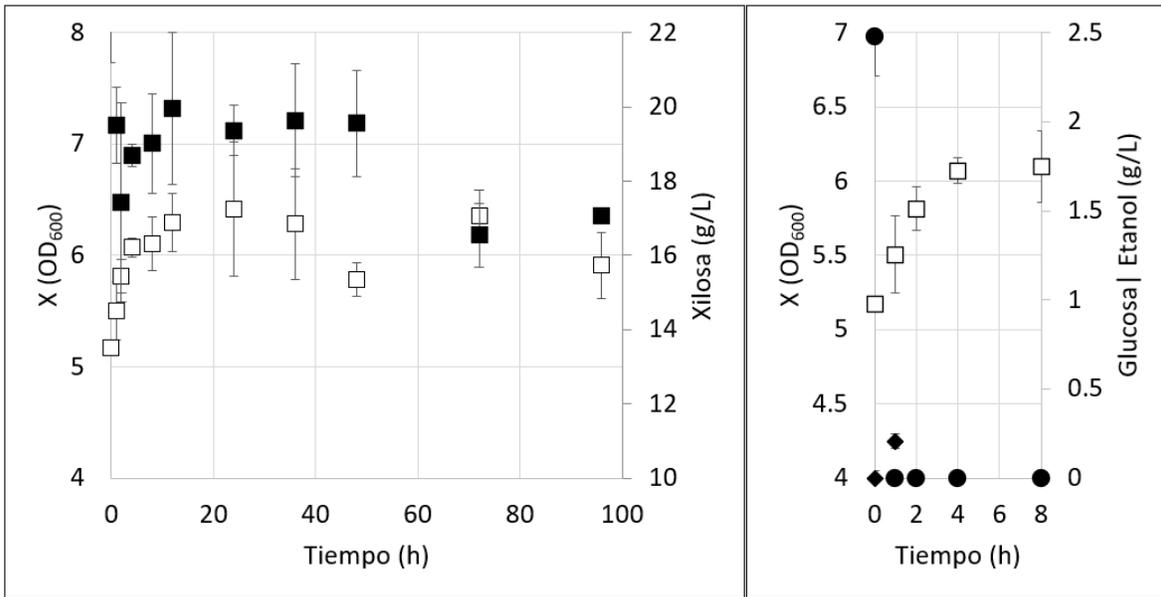


Figura 35: Cinéticas de crecimiento (□), consumo de glucosa (●) y xilosa (■), y producción de etanol (♦) de la cepa silvestre W3031A transformada con el plásmido pSCBXYLA, cultivada a 39 °C y 250 rpm durante 96 horas en medio YNBX₂₀G₂.

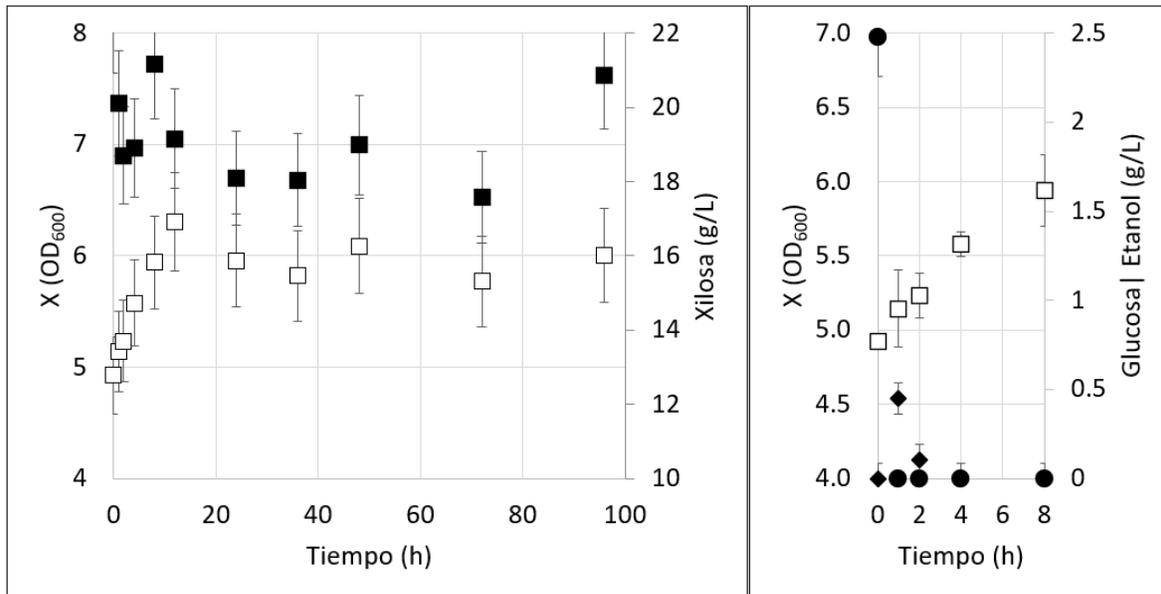


Figura 36: Cinéticas de crecimiento (□), consumo de glucosa (●) y xilosa (■), y producción de etanol (♦) de la cepa silvestre WSCB02 transformada con el plásmido pSCBXYLA, cultivada a 37 °C y 250 rpm durante 96 horas en medio YNBX₂₀G₂.

En la **figura 37** se graficó la concentración de xilosa contra la biomasa generada durante las tres cinéticas en cada una de las repeticiones. Esta figura muestra el comportamiento de las poblaciones en cada temperatura y, en conjunto con el coeficiente de determinación (R^2), permite visualizar con mayor claridad la relación que existe entre el cambio en la concentración de xilosa y el aumento en la biomasa.

Por otra parte, en la ecuación obtenida por mínimos cuadrados de cada población, el coeficiente de la variable x equivale al rendimiento de biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$). Es de destacar que este valor es mayor para la cepa WSCB02[pSCBXyla] (0.25 g/g) en 30°C, lo que sugiere un mejor aprovechamiento de la xilosa en esta condición.

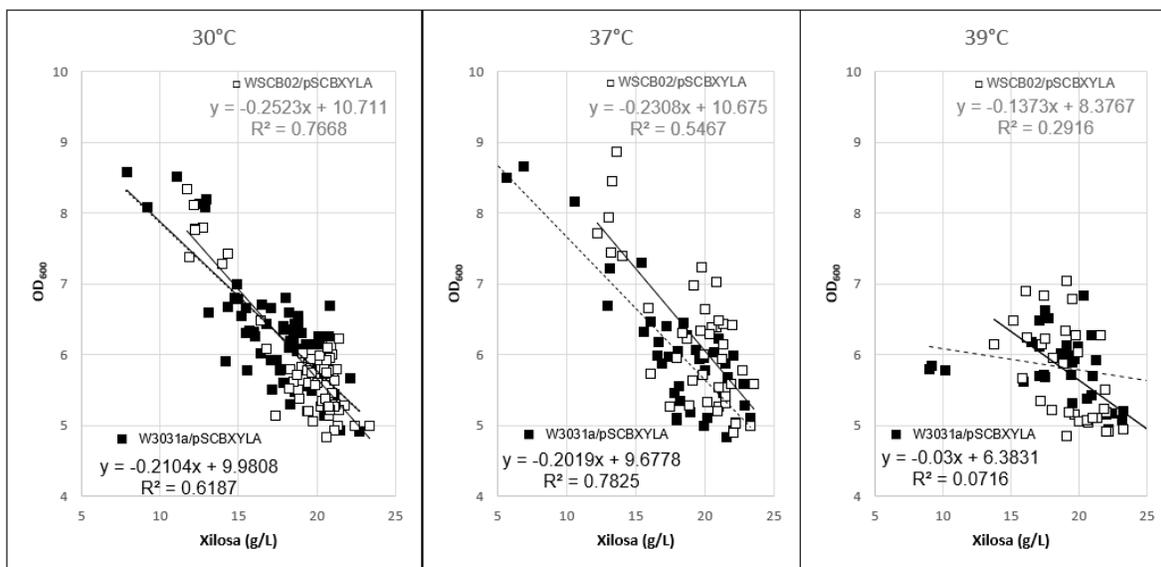


Figura 37: Rendimiento de biomasa por xilosa consumida en todas las réplicas del cultivo de la cepa WT/Xyla a 30 °C, 37 °C y 39 °C. Los datos de producción de biomasa y consumo de xilosa de las 5 réplicas se graficaron para calcular un valor global del rendimiento.

En conjunto, los resultados del cultivo de la dos cepas a 39°C sugieren que: 1) ambas cepas consumen la xilosa, aunque la silvestre es más eficiente; 2) la eficiencia en el consumo de xilosa por la cepa silvestre comparada con la mutante

Δ ERG3 se puede deber a que en la última, la vía oxidativa en la cadena de electrones es ineficiente; 3) lo anterior se explica por el hecho de que a 37 °C, donde la levadura respira más, el consumo de xilosa se duplica comparado con la condición a 30°C; 4) esta ventaja se termina en 39 °C donde *S. cerevisiae* experimenta el deterioro más importante de sus actividades mitocondriales incluyendo la correspondiente a la cadena de transporte de electrones. Dado lo anterior, se sugiere que, dada la baja velocidad de consumo de xilosa, este proceso se está llevando a cabo por la vía oxidativa. Esta vía es menos eficiente en la mutante Δ ERG3, lo cual se demuestra por su baja eficiencia en el consumo de xilosa en las tres temperaturas evaluadas.

9. CONCLUSIONES

La expresión heteróloga del gen *XYLA* de *Piromyces sp.* permitió a la levadura *S. cerevisiae* consumir xilosa. Sin embargo, la eliminación del gen *ERG3* no resultó ser adecuada para metabolizar la xilosa, ni a temperatura óptima (30 °C), ni a temperaturas elevadas (37 °C y 39 °C). Los resultados sugieren que el metabolismo de xilosa se lleva a cabo por la vía respiratoria. Esto limita el desempeño de la mutante *ERG3* cuyo metabolismo es principalmente fermentativo. Es de destacar que la levadura silvestre expresando *XYLA* resultó ser más eficiente para consumir la xilosa a 37 °C donde duplicó el consumo con respecto a 30 °C.

10. PERSPECTIVAS

1. Incrementar el consumo de xilosa para evaluar si es posible que esta se metabolice por la vía fermentativa cuando se aumente su velocidad de consumo. Es posible favoreciendo el ingreso de la xilosa a la levadura tanto agregando transportadores específicos para xilosa como los que expresa *Cattleya intermedia*, mejorando el flujo de xilosa a través de la vía no

oxidativa de pentosas fosfato mediante sobre expresión de la xilulosa cinasa, la transaldolasa y transcetolasa, codificadas por *XKS1*, *TAL1* y *TKL1* respectivamente

2. Continuar con la estrategia de evolución adaptativa en el punto 7.7 hasta alcanzar un número de generaciones apropiado para encontrar mutaciones que favorezcan significativamente el consumo de xilosa (800-1200 generaciones o aplicar la misma estrategia de evolución sobre las cepas que se propone construir en la perspectiva 1.
3. En las levaduras con consumo optimizado de xilosa evaluar su metabolismo a diferentes tensiones de oxígeno disuelto.
4. Si el consumo de xilosa se favorece cuando está más activa la vía oxidativa, realizar una segunda evolución adaptativa para incrementar el consumo de xilosa por la vía fermentativa.
5. En las levaduras evolucionadas para consumir xilosa por la vía fermentativa se podría generar termotolerancia con la eliminación del gen *ERG3* o intentar conferir termo tolerancia con estrategias que no afecten negativamente el metabolismo respiratorio de *S. cerevisiae* como la sobre-expresión de *TPS1*, involucrado en el metabolismo de trehalosa.
6. Aprovechar que *S. cerevisiae* metaboliza xilosa por la vía respiratoria y usarla como fuente de carbono única en una evolución adaptativa en condiciones aerobias. Esto podría generar mutantes con mejor capacidad para consumir fuentes de carbono por la vía oxidativa lo que abre la posibilidad de usar a esta levadura como productora de metabolitos ésteres de esteroides o algunas proteínas recombinantes.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Alfani, F., Gallifuoco, A., Saporosi, A., Spera, A., & Cantarella, M. (2000). Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 25(2), 184–192.
- Andrić, P., Meyer, A. S., Jensen, P. A., & Dam-Johansen, K. (2010). Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnology Advances*, 28(3), 308–324. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.003>
- Angov, E., Hillier, C. J., Kincaid, R. L., & Lyon, J. A. (2008). Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host. *Plos One*, 3(5), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002189>
- Aylon, Y., & Kupiec, M. (2004). New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 566(3), 231–248. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.10.001>
- Bai-Flagfeldt, D., Verena, S., Le, H., & Nielsen, J. (2009). Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 26(August), 545–551. <https://doi.org/10.1002/yea>
- Bastawde, K. B. (1992). Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 8(4), 353–368. <https://doi.org/10.1007/BF01198746>
- Baudin, A., Ozier-kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F., & Cullin, C. (1993). A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 21(14), 3329–3330. <https://doi.org/10.1093/nar/21.14.3329>
- Bobleter, O. (1994). Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. In *Progress in Polymer Science* (Vol. 19, Issue 5, pp. 797–841). [https://doi.org/10.1016/0079-6700\(94\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0079-6700(94)90033-7)
- Cadoche, L., & López, G. D. (1989). Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. *Biological Wastes*, 30(2), 153–157. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(89\)90069-4](https://doi.org/10.1016/0269-7483(89)90069-4)

- Cai, J., He, Y., Yu, X., Banks, S. W., Yang, Y., Zhang, X., Yu, Y., Liu, R., & Bridgwater, A. V. (2017). Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76(October 2016), 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.072>
- Canada, N. R. (2016). Learn the facts: Fuel consumption and CO₂. In *Auto\$mart* (Vol. 2). http://www.nrcan.gc.ca/sites/www.nrcan.gc.ca/files/oeef/pdf/transportation/fuel-efficient-technologies/autosmart_factsheet_6_e.pdf
- Caspeta, L., Buijs, N. A. A., & Nielsen, J. (2013). The role of biofuels in the future energy supply. *Energy and Environmental Science*, 6(4), 1077–1082. <https://doi.org/10.1039/c3ee24403b>
- Caspeta, L., & Castillo, T. (2017). Engineering of microorganisms for the production of chemicals and biofuels from renewable resources. In G. Gosset (Ed.), *Engineering of Microorganisms for the Production of Chemicals and Biofuels from Renewable Resources*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-51729-2>
- Caspeta, L., Chen, Y., Ghiaci, P., Feizi, A., Baskov, S., Hallström, B. M., Petranovic, D., & Nielsen, J. (2014). Altered sterol composition renders yeast thermotolerant. *Science*, 346(6205), 75–78. <https://doi.org/10.1126/science.1258137>
- Caspeta, L., Chen, Y., & Nielsen, J. (2016). Thermotolerant yeasts selected by adaptive evolution express heat stress response at 30 °C. *Scientific Reports*, 6(May), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep27003>
- Chen, H., & Wang, L. (2017). *Technologies for Biochemical Conversion of Biomass*. Elsevier Inc.
- Choudhary, J., Singh, S., & Nain, L. (2017). Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation from diverse environments. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(3), 342–346. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.10.007>
- Davies, B. S. J., & Rine, J. (2006). A role for sterol levels in oxygen sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 174(1), 191–201. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.059964>
- De Antoni, A., & Gallwitz, D. (2000). A novel multi-purpose cassette for repeated integrative epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 246(1–2), 179–185. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00083-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00083-4)

- DeBose-Boyd, R. A. (2008). Feedback regulation of cholesterol synthesis: Sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Research*, 18(6), 609–621. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.61>
- Dekker, R. F. H. (1986). Kinetic, Inhibition, and Stability Properties of a Commercial p-0 - Gluamidase (Cellobiase) Preparation from *Aspergillus niger* and Its Suitability in the Hydrolysis of Lignocellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(1), 1438–1442. [https://doi.org/10.1016/0022-3999\(83\)90113-7](https://doi.org/10.1016/0022-3999(83)90113-7)
- Dutra, T. R., Guimarães, V. M., Varela, E. M., Da Silva Fialho, L., Milagres, A. M. F., Falkoski, D. L., Zanuncio, J. C., & De Rezende, S. T. (2017). A *Chrysosporthe cubensis* enzyme cocktail produced from a low-cost carbon source with high biomass hydrolysis efficiency. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04262-y>
- Fontaras, G., Zacharof, N. G., & Ciuffo, B. (2017). Fuel consumption and CO₂ emissions from passenger cars in Europe – Laboratory versus real-world emissions. *Progress in Energy and Combustion Science*, 60, 97–131. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2016.12.004>
- Galea, A. M., & Brown, A. J. (2009). Special relationship between sterols and oxygen: Were sterols an adaptation to aerobic life? *Free Radical Biology and Medicine*, 47(6), 880–889. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.027>
- Ghosh, K., & Van Duyne, G. D. (2002). Cre-loxp biochemistry. *Methods*, 28(3), 374–383. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00244-X](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00244-X)
- Gietz, R. D., & Schiestl, R. H. (2008). *High-efficiency yeast transformation using the LiAc / SS carrier DNA / PEG method*. 2(1), 31–35. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.13>
- Gonçalves, D. L., Matsushika, A., de Sales, B. B., Goshima, T., Bon, E. P. S., & Stambuk, B. U. (2014). Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. *Enzyme and Microbial Technology*, 63, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.05.003>
- Grabber, J. H. (2005). How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Science*, 45(3), 820–831. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0191>
- Gruno, M., Väljamäe, P., Pettersson, G., & Johansson, G. (2004). Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 86(5), 503–511. <https://doi.org/10.1002/bit.10838>

- Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J., & Hegemann, J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 24(13), 2519–2524. <https://doi.org/10.1093/nar/24.13.2519>
- Ha, S.-J., Galazka, J. M., Kim, S. R., Choi, J.-H., Yang, X., Seo, J.-H., Glass, N. L., Cate, J. H. D., & Jin, Y.-S. (2011). Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2), 504–509. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010456108>
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(5), 937–953. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0827-2>
- Harhangi, H. R., Akhmanova, A. S., Emmens, R., Van Der Drift, C., De Laat, W. T. A. M., Van Dijken, J. P., Jetten, M. S. M., Pronk, J. T., & Op Den Camp, H. J. M. (2003). Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 follows the bacterial pathway. *Archives of Microbiology*, 180(2), 134–141. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0565-0>
- Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
- Hughes, A. L., Todd, B. L., & Espenshade, P. J. (2005). SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. *Cell*, 120(6), 831–842. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.012>
- Ismail, K. S. K., Sakamoto, T., Hatanaka, H., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2013). Gene expression cross-profiling in genetically modified industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during high-temperature ethanol production from xylose. *Journal of Biotechnology*, 163(1), 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.10.017>
- Johnston, M. (1995). *Three Different Regulatory Mechanisms Enable Yeast Hexose Transporter (HXT) Genes To Be Induced by Different Levels of Glucose*. 15(3), 1564–1572.
- Jouzani, G. S., & Taherzadeh, M. J. (2015). Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: A comprehensive review. *Biofuel Research Journal*, 2(1), 152–195. <https://doi.org/10.18331/BRJ2015.2.1.4>

- Karhumaa, Sanchez, Hahn-Hägerdal, & et al. (2007). Comparison of the xylose reductase-xylylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 6(5), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-5>
- Kasavi, C., Finore, I., Lama, L., Nicolaus, B., Oliver, S. G., Toksoy Oner, E., & Kirdar, B. (2012). Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass. *Biomass and Bioenergy*, 45, 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.013>
- Koddenberg, T. (2016). Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites. In *Journal of Cleaner Production* (Vol. 110). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.07.070>
- Kötter, P., & Ciriacy, M. (1993). Microbiology Biotechnology Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 38, 776–783.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713–3729.
- Kuyper, M., Harhangi, H. R., Stave, A. K., Winkler, A. A., Jetten, M. S. M., de Laat, W. T. A. M., den Ridder, J. J. J., Op Den Camp, H. J. M., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2003). High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: The key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? *FEMS Yeast Research*, 4(1), 69–78. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00141-7)
- Kuyper, M., Winkler, A. A., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2004). Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: A proof of principle. *FEMS Yeast Research*, 4(6), 655–664. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.01.003>
- Lee, M., Rozeboom, H. J., De Waal, P. P., De Jong, R. M., Dudek, H. M., & Janssen, D. B. (2017). Metal Dependence of the Xylose Isomerase from *Piromyces sp.* E2 Explored by Activity Profiling and Protein Crystallography. *Biochemistry*, 56(45), 5991–6005. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00777>
- Lehninger, A., Nelson, D., & Cox, M. (2005). Lehninger Principles of Biochemistry. In 1982 (4th ed., Vol. 1, Issue 1). Worth Publisher.
- Lööke, M., Kristjuhan, K., & Kristjuhan, A. (2017). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques*, 62(1), v. <https://doi.org/10.2144/000114497>

- Ma, H., Kunes, S., Schatz, P., & Botstein, D. (1987). Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene*, 58(6), 2001–2016. <https://doi.org/10.2144/01316bm03>
- Mäkelä, M. R., Donofrio, N., & De Vries, R. P. (2014). Plant biomass degradation by fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 72, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.08.010>
- Moysés, D. N., Reis, V. C. B., de Almeida, J. R. M., de Moraes, L. M. P., & Torres, F. A. G. (2016). Xylose fermentation by *saccharomyces cerevisiae*: Challenges and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms17030207>
- Nanda, S., Azargohar, R., Dalai, A. K., & Kozinski, J. A. (2015). An assessment on the sustainability of lignocellulosic biomass for biorefining. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 925–941. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.058>
- Panedy, A., Larroche, C., Ricke, S. C., Dussap, C.-G., & Gnansounou, E. (2011). *Biofuels - Alternative Feedstocks and Conversion Processes* (First). Elsevier Inc.
- Partow, S., Verena, S., Bjørn, S., Nielsen, J., & Jerome, M. (2010). Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 27(July), 995–964. <https://doi.org/10.1002/yea>
- Petrezselyova, S., Zahradka, J., & Sychrova, H. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance. *Fungal Biology*, 114(2–3), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2009.11.002>
- Pronk, J. T. (2002). Auxotrophic Yeast Strains in Fundamental and Applied Research. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2095–2100. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2095>
- Reifenberger, E., Freidel, K., & Ciriacy, M. (1995). Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose glycolytic flux. *Molecular Microbiology*, 16(1), 157–167.
- Reilly, P. J. (1981). Xylanases: structure and function. *Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals*, 111–129.
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 279–291. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x>
- Smith, S. J., & Parks, L. W. (1993). The ERG3 gene in *Saccharomyces cerevisiae* is required for the utilization of respiratory substrates and in heme-deficient cells [published erratum appears in *Yeast* 1994 Apr;10(4):557]. *Yeast*, 9(11), 1177–1187.

- Smith, S. J., & Parks, L. W. (1994). Erratum to: The ERG3 gene in *Saccharomyces cerevisiae* is required for the utilization of respiratory substrates and in heme deficient cells. In *Yeast* (Vol. 10, Issue 4, pp. 557–557). <https://doi.org/10.1002/yea.320100416>
- Soccol, C. R., Faraco, V., Karp, S. G., Vandenberghe, L. P. S., Thomaz-Soccol, V., Woiciechowski, A. L., & Pandey, A. (2019). Lignocellulosic bioethanol: Current status and future perspectives. In *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels* (Issue 14, pp. 331–354). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816856-1.00014-2>
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2017). Principles of fermentation technology. In *Elsevier Ltd.* (3rd ed., Vol. 3, Issue 9). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(85\)90016-2](https://doi.org/10.1016/0167-7799(85)90016-2)
- Takagi, M. (1984). Inhibition of Cellulase by Fermentation Products. *Biotechnology and Bioengineering*, *26*, 1506–1507.
- Toivola, A., Yarrow, D., & Van Den Bosch, E. (1984). Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, *47*(6), 1221–1223. <https://doi.org/10.1128/aem.47.6.1221-1223.1984>
- Tomás-Pejó, E., Oliva, J. M., Ballesteros, M., & Olsson, L. (2008). Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and Bioengineering*, *100*(6), 1122–1131. <https://doi.org/10.1002/bit.21849>
- van Leeuwen, J., Andrews, B., Boone, C., & Tan, G. (2015). Rapid and Efficient Plasmid Construction by Homologous Recombination in Yeast. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2015*(9), pdb.prot085100. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot085100>
- Vilela, L. de F., de Araujo, V. P. G., Paredes, R. de S., Bon, E. P. da S., Torres, F. A. G., Neves, B. C., & Eleutherio, E. C. A. (2015). Enhanced xylose fermentation and ethanol production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. *AMB Express*, *5*(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0102-y>
- Walfridsson, M., Hallborn, J., Penttila, M., Keranen, S., & Hahn-Hagerdal, B. (1995). Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(12), 4184–4190.

- Wasylenko, T., & Stephanopoulos, G. (2015). Metabolomic and 13 C-Metabolic Flux Analysis of a Xylose- Consuming *Saccharomyces cerevisiae* Strain Expressing Xylose Isomerase. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(3), 470–483. <https://doi.org/10.1002/bit.25447>
- Wyman, C. E. (2007). What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends in Biotechnology*, 25(4), 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.02.009>
- Wyman, C., Spindler, D., & Grohmann, K. (1992). Simultaneous and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 3(5), 301–307.
- Zhou, H., Cheng, J. sheng, Wang, B. L., Fink, G., & Stephanopoulos, G. (2012). Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 14(6), 611–622. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.07.011>

12. MATERIAL ADICIONAL

12.1 Apéndice A

Secuencia de gen *XYLA* de *Piromyces sp. E2* obtenida de GeneBank con el código de acceso AJ249909. En amarillo se indica la región identificada como el marco de lectura del gen *XYLA*.

GTAAATGGCTAAGGAATATTTCCACAAATTCAAAAGATTAAGTTCGAAGGTAAGGATT
CTAAGAATCCA

TTAGCCTTCCACTACTACGATGCTGAAAAGGAAGTCATGGGTAAGAAAATGAAGGATT
GGTTACGTTTCG

CCATGGCCTGGTGGCACACTCTTTGCGCCGAAGGTGCTGACCAATTCGGTGGAGGTA
CAAAGTCTTTCCC

ATGGAACGAAGGTAAGTACTGATGCTATTGAAATTGCCAAGCAAAGGTTGATGCTGGTTTC
GAAATCATGCAA

AAGCTTGGTATTCCATACTACTGTTTCCACGATGTTGATCTTGTTTCCGAAGGTAAGTCT
TATTGAAGAAT

ACGAATCCAACCTTAAGGCTGTCGTTGCTTACCTCAAGGAAAAGCAAAGGAAACCGG
TATTAAGCTTCT

CTGGAGTACTGCTAACGTCTTCGGTCACAAGCGTTACATGAACGGTGCCTCCACTAAC
CCAGACTTTGAT

GTTGTCGCCCGTGCTATTGTTCAAATTAAGAACGCCATAGACGCCGGTATTGAACTTG
GTGCTGAAAAC

ACGTCTTCTGGGGTGGTCGTGAAGGTTACATGAGTCTCCTTAACACTGACCAAAAAGCG
 TGAAAAGGAACA
 CATGGCCACTATGCTTACCATGGCTCGTGACTACGCTCGTTCCAAGGGATTCAAGGGT
 ACTTTCCTCATT
 GAACCAAAGCCAATGGAACCAACCAAGCACCAATACGATGTTGACACTGAAACCGCTA
 TTGGTTTCCTTA
 AGGCCCAACTTAGACAAGGACTTCAAGGTCAACATTGAAGTTAACCACGCTACTCTT
 GCTGGTCACAC
 TTTGGAACACGAACTTGCCTGTGCTGTTGATGCTGGTATGCTCGGTTCCATTGATGCTA
 ACCGTGGTGAC
 TACCAAACCGTTGGGATACTGATCAATCCCAATTGATCAATACGAACTCGTCCAAGC
 TTGGATGGAAA
 TCATCCGTGGTGGTGGTTTTCGTACTGGTGGTACCAACTTCGATGCCAAGACTCGTCG
 TAACTCTACTGA
 CCTCGAAGACATCATCATTGCCACGTTTCTGGTATGGATGCTATGGCTCGTGCTCTT
 GAAAACGCTGCC
 AAGTCCTCCAAGAATCTCCATACACCAAGATGAAGAAGGAACGTTACGCTTCCTTCG
 ACAGTGGTATTG
 GTAAGGACTTTGAAGATGGTAAGCTCACCTCGAACAAGTTTACGAATACGGTAAGAA
 GAACGGTGAACC
 AAAGCAAACCTTCTGGTAAGCAAGAACTCTACGAAGCTATTGTTGCCATGTACCAATAAG
 TTAATCGTAGT
 TAAATTGGTAAAATAATTGTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
 GATCCTATCT
 CTGTACTAATTAATATAGTACAAAAAAAATGTATAAACAAAAAAAAGTCTAAAAGACG
 GAAGAATTTA
 ATTTAGGGAAAAATAAAAAATAATAAACAATAGATAAATCCTTTATATTAGGAAAAT
 GTCCCATTGT
 ATTATTTTCATTTCTACTAAAAAAGAAAGTAAATAAAACACAAGAGGAAATTTTCCCTTTT
 TTTTTTTTT
 TGTAATAAATTTTATGCAAATATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA

12.2 Apéndice B

Secuencia de gen *XYLA* de *Piromyces* sp. *E2* armonizada.

ATGGCTAAGGAATACTTTCCTCAAATTCAAAAGATTAAGTTTGAAGGTAAGGATTCTAA
 GAATCCTTTGGCGTTTCACTATTATGATGCTGAAAAGGAAGTGATGGGTAAGAAAATGAAGGAT
 TGGTTGAGATTTGCGATGGCGTGGTGGCACACTTTGTGCGCGGAAGGTGCTGACCAATTTGGT
 GGAGGTACGAAGTCTTTTCCCTTGAACGAAGGACTGATGCTATTGAAATTGCGAAGCAAAAG
 GTTGATGCTGGTTTTGAAATCATGCAAAGTTGGGTATTTCCTTATTATTGTTTTACGATGTTGA

TTTGGTTAGCGAAGGTAAGTCTATTGAAGAATATGAAAGCAACTTGAAGGCTGTGGTTGCTTAT
CTCAAGGAAAAGCAAAAGGAAACGGGTATTAAGTTGCTCTGGTCTACTGCTAACGTGTTTGGT
CACAAGAGATATATGAACGGTGCAGACTAACCTGACTTCGATGTTGTGGCGAGAGCTATT
GTTCAAATTAAGAACGCGATGGACGCGGGTATTGAATTGGGTGCTGAAAACCTATGTGTTTTGG
GGTGGTAGAGAAGGTTATATGTCTCTCTTGAACACTGACCAAAAAGAGAGAAAAGGAACACATG
GCGACTATGTTGACGATGGCTAGAGACTATGCTAGAAGCAAGGGATTTAAGGGTACTTTTTCTC
ATTGAACCTAAGCCTATGGAACCTACGAAGCACCAATATGATGTTGACACTGAAACGGCTATTG
GTTTTTTGAAGGCGCACAACTTGGACAAGGACTTTAAGGTGAACATTGAAGTTAACCACGCTAC
TTTGGCTGGTCACACTTTTGAACACGAATTGGCGTGTGCTGTTGATGCTGGTATGCTCGGTAG
CATTGATGCTAACAGAGGTGACTATCAAACGGTTGGGATACTGATCAATTTCTATTGATCAA
TATGAACTCGTGCAAGCTTGGATGGAAATCATCAGAGGTGGTGGTTTTGTTACTGGTGGTACG
AACTTTGATGCGAAGACTAGAAGAACTCTACTGACCTCGAAGACATCATCATTGCGCACGTTT
CTGGTATGGATGCTATGGCTAGAGCTTTGGAAAACGCTGCGAAGCTCCTCCAAGAATCTCCTT
ATACGAAGATGAAGAAGGAAAGATATGCTAGCTTTGACTCTGGTATTGGTAAGGACTTCGAAGA
TGGTAAGCTCACGCTCGAACAAGTTTATGAATATGGTAAGAAGAACGGTGAACCTAAGCAAAC
TCTGGTAAGCAAGAACTCTATGAAGCTATTGTTGCGATGTATCAATAG

12.3 Apéndice C

Preparación de células electro-competentes de *E. coli* y electro-transformación. Protocolo estandarizado en consorcio Bolívar-Gosset-Martínez, Instituto de Biotecnología UNAM.

Células electro-competentes

1. A partir de una cepa crio-preservada en glicerol a -70 °C, se inocularon 4 mL de medio YENB en un tubo de 16 x 150 mm, se incubó a 37 °C y 300 rpm toda la noche.
2. A partir del cultivo saturado se utilizaron 0.25 mL para inocular 50 mL de medio YENB en un matraz de 500 mL, y se incubó a 37 °C y 300 rpm.
3. Se monitoreó el cultivo durante la fase logarítmica leyendo la OD₆₀₀. Cuando el cultivo alcanzó entre 0.5 - 0.9 unidades (aproximadamente 2 horas para las cepas silvestres) el matraz fue transferido a un recipiente con hielo por 15 minutos.
4. El cultivo se transfirió a tubos cónicos de 50 mL pre-enfriados y fueron centrifugados a 8000 G por 5 minutos a 4 °C. El medio de cultivo se eliminó por decantación y se conservó en el tubo la pastilla de biomasa.
5. Se lavó la pastilla con 5 mL de agua estéril fría sin agitar el tubo. Se centrifugó a 8000 G por 5 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante.

6. Se repitió el lavado del paso 5.
7. Se resuspendió la pastilla en un volumen total de 2 mL de glicerol 10 % frío, se centrifugó a 8000G por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante con una micropunta estéril.
8. Las células se re-suspendieron en un solo microtubo con un volumen final de 0.5 mL de glicerol 10 % frío.
9. El volumen de células se fraccionó en microtubos de 0.6 ml con 50 μ L de células competentes y se colocaron en hielo seco por 5 minutos. Finalmente, se almacenaron a -70 °C. Para calcular la eficiencia de las células, 50 μ L deben transformarse con 1 ng de un plásmido superenrollado.

Electro-transformación

1. Las células fueron descongeladas en hielo y agitadas cuidadosamente con un chasquido.
2. A una alícuota de 50 μ L de células competentes se le agregó de 1 a 4 μ L de DNA.
3. La suspensión de células y DNA se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.1 o 0.2 mm pre-enfriada.
4. Se electroporó siguiendo las instrucciones del equipo de electroporación (Eppendorf 94000017 Electroporator, 220 VAC, 50 Hz). Preferiblemente 1800 V para celdas de 0.1 mm y 2500 V para celdas de 0.2 mm.
5. Se removió la cubeta de la cámara e inmediatamente se adicionaron 950 μ L de medio S.O.C. (2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20 mM de dextrosa) sin antibióticos y se mezcló pipeteando firmemente hasta Resuspender las células del fondo
6. El contenido se transfirió a un tubo de cultivo de 13 x 100 mm y fue incubado con agitación a 300 rpm a 37 °C durante 1 h.
7. Se sembró 1/10 (100 μ L) de las células en una caja Petri con medio LB sólido con el antibiótico de selección utilizando perlas de vidrio. Se incubó toda la noche a 37 °C. El resto de las células transformadas se mantuvo a 4°C.

12.4 Apéndice D

Extracción de DNA plasmídico de cepas de *E. coli*. Protocolo estandarizado en consorcio Bolívar-Gosset-Martínez, Instituto de Biotecnología UNAM.

1. Se picó con la punta de un palillo estéril una colonia de bacterias que contenía un plásmido que confiere resistencia a un antibiótico, se inoculó en 4 mL de medio LB más el antibiótico correspondiente y se incubó a 37 °C toda la noche.
2. Fueron transferidos 1.5 mL del cultivo saturado a un microtubo, posteriormente fue centrifugado a 16,873 G por 1 minuto a temperatura ambiente y el sobrenadante se descartó.

3. Se lavó la pastilla en 1 mL de solución I, también llamada solución SET (iniciales de Sacarosa, EDTA y Tris) fría y agitada con vórtex por 5 minutos.
4. Se centrifugó el tubo a 16,873 G por 1 minuto a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante.
5. La pastilla fue resuspendida en 150 μ L de solución 1 + 5 μ L de RNasa y se agitó por 5 minutos en vortex.
6. Se adicionaron 350 μ L de la solución 2 (preparada al momento) y se mezcló por inversión 6 veces.
7. Se incubó de 10 minutos en hielo.
8. Fueron agregados 250 μ L de la solución 3 fría y se mezcló por inversión 6 veces.
9. Se Incubó por 90 minutos en hielo.
10. Se centrifugó a 16,873 G por 5 minutos a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante por decantación en un tubo nuevo; desechando la pastilla.
11. Fueron agregados 650 μ L de isopropanol para precipitar el DNA plasmídico y se agitó por inversión 6 veces.
12. Se centrifugó a 16,873 G por 5 minutos, el sobrenadante fue eliminado por decantación. Al final de este paso, pudo distinguirse un precipitado mínimo en el fondo del tubo.
13. A la pastilla se le agregó 1 mL de etanol al 70 %, fue agitada en vortex por 5 minutos y centrifugada a 16,873 G. El sobrenadante se eliminó por decantación.
14. La pastilla se secó en un concentrador al vacío a temperatura ambiente por 5 minutos y se resuspendió en 50 μ L de TE pH 8.0.
15. Se cuantificaron 2 μ L en gel de agarosa al 1 % y espectrofotométricamente con 2 μ L en *NanoDrop*. El DNA se almacenó a -20 °C.

Soluciones

- Solución 1: Sacarosa 20 % 60 g, EDTA 0.05 M 60 mL de una solución madre 0.25 M pH 8.0, Tris-HCl 0.05 M 15 mL de una solución madre 1 M pH 8.0. El pH de la solución fue de 8.0.
- Solución 2: SDS 2 %, NaOH 0.4 N en proporción 1:1. Fue preparada al momento de ser utilizada.
- Solución 3: Acetato de potasio 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato. La solución tuvo un pH 4.8, se filtró utilizando un filtro de 0.45 μ m.

12.5 Apéndice E

Extracción de DNA plasmídico de *S. cerevisiae*. Protocolo estandarizado por Caheri Salas Navarrete, Instituto de Biotecnología UNAM.

1. Se inocularon 2 mL de medio YPD en un tubo de 20mL con una colonia aislada proveniente de medio sólido YPD con menos de 2 meses de antigüedad. Se incubó a 30°C y 300 rpm durante 16 horas o hasta un valor de OD₆₀₀ de 3.
2. El medio se colocó y centrifugó a 16,873 G en un microtubo estéril de 1.5mL por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante por decantación.
3. Se agregó 1mL de agua MilliQ estéril al tubo y se mezcló en vortex por 5 minutos. Posteriormente, se repitió la centrifugación y eliminación de sobrenadante del paso anterior. Este paso se realizó 2 veces.
4. La pastilla celular se resuspendió en 150µL de Sorbitol 1M/EDTA 100mM.
5. Se agregaron 10 µL de Liticasa 20µg/ µL y se incubó 2 horas a 37°C y 300rpm.
6. Fueron agregados 350 µL del amortiguador P2 del kit comercial QIAprep *Miniprep* (QUIAGEN) y se mezcló por inversión 6 veces. Inmediatamente, se incubó en hielo durante 10 minutos.
7. Se agregaron 350 µL del amortiguador N3 del kit comercial QIAprep *Miniprep* (QUIAGEN) y se mezcló por inversión 6 veces. El tubo se incubó en hielo durante 90 minutos.
8. Se centrifugó a 16,873 G por 15 minutos y se transfirió el sobrenadante a un microtubo nuevo.
9. El contenido del tubo fue transferido a una columna QIAprep 2.0 spin (700 µL volumen máximo) nueva del kit comercial QIAprep *Miniprep* (QUIAGEN) y centrifugado a 16,873G por 1 minuto. El sobrenadante fue descargado. Este proceso se repitió hasta haber pasado todo el sobrenadante por la columna.
10. La columna se lavó adicionando 500 µL del amortiguador PB del kit comercial QIAprep *Miniprep* y centrifugando a 16,873 G por 1 minuto. El sobrenadante fue descartado.
11. Se lavó la columna con 750 µL del amortiguador PE del kit comercial QIAprep *Miniprep* (QUIAGEN) y centrifugando a 16,873 G por 1 minuto; nuevamente se descartó el sobrenadante. Se repitió la centrifugación para eliminar los residuos del amortiguador por completo.
12. La columna fue transferida a un microtubo nuevo de 1.5 mL. Se le agregaron 50 µL del amortiguador EB precalentado a 60°C del kit comercial QIAprep *Miniprep*, y se dejó reposar sobre la mesa por 5 minutos. Finalmente se centrifugó a 16,873 G por 1 minuto para eluir el DNA.

12.6 Apéndice F

Tabla y gráfica de correlación de densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) y peso seco de biomasa (DCW) de la cepa W3031A realizada por Arturo Iván Montes de Oca Miranda, datos no publicados.

Tiempo (horas)	OD ₆₀₀	DCW (g/L)
0	0.296	0.20
4	0.674	0.63
6	1.631	0.63
8	2.563	2.93
10	4.57	3.60

DO₆₀₀ vs DCW (g/L)
W3031A

