



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio bioquímico del efecto de la modificación simultánea  
de la demanda de ATP y de la inhibición de la hexocinasa  
(Hxk2) sobre la velocidad de producción de etanol en  
*Saccharomyces cerevisiae*

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ARCOS RAMOS DIANA IZALIA



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE	PROFESOR:	AGUILAR CABALLERO RAÚL GENARO
VOCAL	PROFESOR:	WACHER RODARTE MARÍA DEL CARMEN
SECRETARIO	PROFESOR:	QUEZADA PABLO HÉCTOR
SUPLENTE 1	PROFESOR:	REYO HERRERA AGUSTÍN
SUPLENTE 2	PROFESOR:	RUIZ TERÁN FRANCISCO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Juan Badiano No. 1, Sección XVI 14080. Departamento de Bioquímica.

**ASESOR DEL TEMA**

---

DR. HÉCTOR QUEZADA PABLO

**SUSTENTANTE**

---

DIANA IZALIA ARCOS RAMOS

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la UNAM mi *alma mater*, por haber sido mi segundo hogar, casi literalmente. Porque orgullosamente mi corazón ha sido, es y será siempre azul y oro.

A mi asesor y gran amigo Héctor, por compartirme sus conocimientos, por el apoyo incondicional a lo largo de este largo viaje y sobre todo por hacerlo agradable, por ser un gran equipo.

A la Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte y al profesor Raúl Aguilar Caballero por la revisión de mi trabajo para enriquecerlo y por su disposición para ser parte del mismo.

A Reyo y a Pancho por ser parte de mi jurado, por el apoyo durante la carrera y por su amistad.

Gracias a todas las personas, compañeros y amigos que siempre han estado a mi lado durante todo el proceso.

Infinitamente gracias a mi familia, tíos, primos, cuñadas, cuñados, abuelos por su confianza y cariño. Los amo.

## DEDICATORIAS

**Panchito y María**, esto es para ustedes, con todo mi corazón, con esfuerzo, dedicación, sufrimiento, alegría. A ustedes que me han dado todo a manos llenas. Gracias a ustedes soy la persona que soy. Gracias por impulsarme y enseñarme a caminar, por creer en mi y por esperar. Lento pero seguro, lo logramos mis amores. Los amo, son unos padres ejemplares.

**Abuelita Rosita**, gracias chulita por todas tus oraciones, son mis más grandes y preciados amuletos. Te amo.

**Pipa**, hermano eres un fregonazo, gracias por tus consejos, tu paciencia, tu ayuda y compañía durante toda la carrera, tus preocupaciones y cuidados, te admiro y te amo, definitivamente no hubiera sido lo mismo sin ti.

**Paco**, hermano otro fregonazo, qué mejor ejemplo que ustedes. Siempre acompañándome y cuidándome. Haciendo la vida más ligera, con tantas risas y tus locuras. Gracias, por tu confianza y consejos. Siempre en mi corazón y en mis pensamientos aunque estés al otro lado del charco. Te amo.

## INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	5
- Etanol como biocombustible (bioetanol).....	5
- Glicólisis en eucariontes.....	7
- Conversión de piruvato a etanol. Fermentación alcohólica.....	8
- Vía glicolítica en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	9
Principales puntos de control de flujo.....	9
- Inhibición de la enzima hexocinasa 2 (hxc2) por trehalosa-6-fosfato en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	13
Biosíntesis de la trehalosa en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	15
- Demanda de ATP por efecto del uso de benzoato de sodio.....	17
Ácido benzoico.....	18
- Hexocinasa 2.....	22
Regulación transcripcional de genes.....	22
- Metabolismo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	23
HIPÓTESIS.....	25

## OBJETIVOS

- Objetivo general..... 25
- Objetivos particulares..... 25

## MATERIALES Y MÉTODOS..... 27

- Extracción de DNA genómico..... 27
- Diseño de oligonucleótidos..... 28
- Amplificación de DNA por PCR..... 30
  - Visualización del producto de PCR por electroforesis..... 32
  - Purificación del gen amplificado. Purificación del gel..... 32
- Ligación a vector pGEM T-easy..... 33
  - Adición de colas de adenina..... 33
  - Ligación a vector pGEM T-easy..... 34
- Transformación a bacterias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ ..... 36
  - Purificación del plásmido mini preps..... 37
  - Digestiones confirmativas..... 38
- Ligación a vector multicopia para levaduras pRS426..... 38
  - Desfosforilación..... 39
  - Clonación del gen SPHXX2 en el vector multicopia para levaduras pRS426..... 40
- Secuenciación..... 42

- Transformación a levaduras.....	42
- Extracción de RNA.....	44
Síntesis de cDNA a partir de RNA.....	45
Comparación de los niveles de transcripción del gen <i>SpHXK2</i> .....	45
- Cultivos.....	46
Preparación de medios de cultivo.....	46
Condiciones de crecimiento.....	48
Pre-cultivo.....	48
- Parámetros a evaluar durante la fermentación.....	49
Evaluación del crecimiento durante la fermentación mediante la determinación de la densidad óptica. Curvas de crecimiento.....	49
- Cuantificación de etanol por cromatografía de gases.....	50
- Preparación de extractos celulares y ensayos enzimáticos.....	51
Actividad enzimática de hexocinasa.....	51
- Cuantificación de proteína.....	53
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
- Clonación del gen <i>SpHXK2</i> en el plásmido pRS426 (BY4741/pDS <i>SpHXK2</i> ).....	54
- Actividad enzimática de la hexocinasa sobre-expresada.....	56
- Comparación de los niveles de transcripción del gen <i>SpHXK2</i> .....	57
- Evaluación del crecimiento en condiciones microaeróbicas	



(BY4741/pRS426 vs BY4741/pDSpHKK2).....	59
- Producción de etanol (BY4741/pRS426 vs BY4741/pDSpHKK2).....	61
- Atmósfera microaeróbica (BY4741/pRS426 vs hxk2Δ/pRS426).....	62
Producción específica de etanol.....	62
Crecimiento microaeróbico.....	63
Velocidad específica de crecimiento.....	64
- Atmósfera aeróbica (BY4741/pRS426 vs hxk2Δ/pRS426).....	64
Producción específica de etanol.....	64
Crecimiento aeróbico.....	65
Velocidad específica de crecimiento.....	66
- Porcentaje de etanol en condiciones microaeróbicas y aeróbicas.....	67
- Velocidad específica de producción de etanol.....	68
 CONCLUSIONES.....	 70
 APÉNDICE.....	 72
 BIBLIOGRAFÍA.....	 76

## RESUMEN

En la actualidad el etanol utilizado como biocombustible es una fuerte apuesta para el futuro de los combustibles buscando remplazar a los combustibles derivados del petróleo y de esta manera reducir las emisiones de gas y disminuir así el calentamiento global. Por otro lado, la importancia de estudiar la regulación de la vía glicolítica en *Saccharomyces cerevisiae* ha ido en aumento debido a su potencial uso en la tecnología de la fermentación y por consiguiente en su producción de etanol.

En el presente trabajo se evaluaron dos estrategias experimentales intentando conseguir un efecto sinérgico sobre la velocidad de producción de etanol en *Saccharomyces cerevisiae*, aumentar la demanda de ATP (utilizando benzoato de sodio) y disminuir el efecto de inhibición de la hexocinasa por trehalosa-6-fosfato.

Esto se logró cultivando en presencia de benzoato de sodio una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que sobre-expresa el gen heterólogo SpHXK2 el cual proviene de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* el cual ha sido reportado codifica para una hexocinasa insensible a trehalosa-6-fosfato (Bonini BM, *et al* 2003). Los resultados indican que no ocurrió el esperado efecto sinérgico debido a un mecanismo de regulación post-transcripcional que evita que la enzima heteróloga sea activa. Debido a que no se pudo observar tal efecto, se hizo un estudio de la velocidad de producción de etanol en una cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* la cual tiene interrumpido al gen que codifica para la hexocinasa dos (*hvk2Δ*) y conserva la hexocinasa 1, comparándola con la cepa

silvestre (BY4741). El objetivo de utilizar a esta cepa mutante era demostrar que la actividad de hexocinasa (HXK) estuviera limitando a la glicólisis, por lo tanto la producción de alcohol en dicha cepa se vería disminuida. Se cultivaron a estas cepas en condiciones de atmósfera aeróbica y microaeróbica a diferentes concentraciones de benzoato de sodio y a pesar de que la disminución en la velocidad de producción de etanol en la cepa mutante no fue tan notable en comparación con la cepa silvestre, los resultados demostraron que en efecto aumentó la velocidad de producción de etanol en presencia de benzoato de sodio en ambas cepas.

## INTRODUCCIÓN

El etanol hoy en día es de importancia ambiental debido a que es un potencial biocombustible sustituto de las gasolinas que se obtiene a partir de la fermentación de azúcares provenientes de fuentes vegetales, lo cual representa una fuente de combustible sustentable y ecológica que contribuiría a la disminución en el efecto invernadero. *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura encargada de llevar a cabo esta conversión de azúcares a etanol y debido a su importancia biotecnológica así como a su importancia comercial e industrial, diversos estudios se han enfocado en entender la regulación de la vía glicolítica en *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo hasta la fecha no se han entendido a fondo los mecanismos que regulan el flujo glicolítico y la producción de etanol. Se sabe que el control se distribuye entre diversas enzimas de la vía glicolítica, así como entre sus transportadores. Sin embargo, no se han identificado las etapas particulares que limitan el flujo de la vía *in vivo*. La hexocinasa tipo 2 (HXK) es una de las enzimas que junto con la fosfofructocinasa (PFK) y la piruvato cinasa (PYK), se han propuesto como puntos de control. La HXK cataliza la primera reacción de la vía glicolítica, esto es, se encarga de fosforilar a la glucosa interna a glucosa 6-fosfato y es sometida a inhibición *in vivo* por trehalosa 6-fosfato (Blázquez MA, *et al* 1993). Estudios en donde se utilizan cepas mutantes en las que, de manera independiente, se les ha eliminado la inhibición, no presentan un aumento en la velocidad de producción de etanol.

Por otro lado, se ha demostrado, que incrementando el requerimiento de ATP en una cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae*, el flujo glicolítico se ve aumentado dos veces (Daran-Lapujade P, *et al* 2007).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y considerando que actualmente se acepta el uso simultáneo de diferentes estrategias como herramientas para la generación exitosa de cepas sobre-productoras de algún metabolito, nuestro proyecto se enfocó en aumentar la demanda de ATP y en reducir el efecto de la inhibición de la hexocinasa por trehalosa-6-fosfato simultáneamente para ver si estas dos modificaciones presentaban un efecto sinérgico sobre la velocidad de producción de etanol.

Es necesario a partir de estos experimentos continuar el estudio de la regulación de la vía glicolítica, así como utilizar otras estrategias de manera simultánea tales que permitan obtener una cepa en la que se obtenga un aumento significativo de la velocidad de producción de etanol de tal modo que los conocimientos generados ayuden al mejor entendimiento de la regulación de la glicólisis y a la obtención de cepas de uso industrial.

## **ANTECEDENTES**

### **ETANOL COMO BIOCOMBUSTIBLE (BIOETANOL)**

Ante la actual preocupación que se tiene por la escasez del petróleo a causa de su sobreexplotación, además de los efectos adversos sobre la salud de las personas consecuencia de la contaminación ambiental causada por los contaminantes provenientes de la combustión de los combustibles fósiles y el requerimiento de energía a nivel global que cada vez es mayor, se han estudiado y propuesto fuentes alternativas de energía producidas naturalmente a partir de fuentes renovables como los biocombustibles, los cuales están destinados al sector de transporte para ser utilizados como sustitutos de combustibles derivados del petróleo como el diesel y la gasolina (Demirbas A, 2008) y los cuales resultan ser más amigables con el medio ambiente.

El bioetanol o alcohol etílico es un biocombustible líquido producto de la fermentación de azúcares provenientes de fuentes vegetales (biomasa), que es llevada a cabo por la acción de microorganismos principalmente levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*. Es el biocombustible más producido en el mundo, en la actualidad su producción representa el 94% de la producción total de biocombustibles del mundo y se utiliza en vehículos como sustitutivo de la gasolina, bien como único combustible o en mezclas. Es ampliamente utilizado hoy en día en los Estados Unidos y en Brasil. En Brasil el bioetanol para combustible es derivado de la caña de azúcar y es utilizado puro o mezclado con gasolina en una mezcla que se conoce como gasohol (24% bioetanol, 76%

gasolina). En diversos lugares de los Estados Unidos, la cantidad de bioetanol añadida a la gasolina es 10% por volumen, se conoce como gasohol o E10. Brasil y Estados Unidos son los líderes mundiales, los cuales explotan caña de azúcar y maíz, respectivamente, y que en conjunto representan alrededor del 70% de la producción de bioetanol del mundo (Balat M, *et al* 2008).

México se beneficiaría de la introducción del etanol como combustible de muchas formas como por ejemplo en la creación de empleos, conservación de los recursos petrolíferos, ahorro en los intercambios exteriores, motivación de la comunidad científica y tecnológica para desarrollar organismos con mayor capacidad fermentativa, etc. Debido a esto, cada vez se están realizando más estudios e investigaciones para mejorar la eficiencia de los microorganismos utilizados en el proceso.

En este proyecto el enfoque fue obtener una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* la cual pudiera incrementar su velocidad de producción de etanol, esto mediante la utilización de dos estrategias llevadas a cabo de manera simultánea. De esta forma, a partir de este estudio, aportar algunos conocimientos para la mayor comprensión de la regulación de la glicólisis y probablemente para la obtención de cepas de uso industrial en la síntesis de bioetanol.

## GLICÓLISIS EN EUCARIONTES

La glicólisis es una importante ruta metabólica que consiste en una serie de reacciones enzimáticas que oxidan una molécula de hexosa (6C) en dos moléculas de piruvato (3C) para obtener energía (ATP) (Figura 1).

Esta conversión da como resultado la obtención de una ganancia neta de energía de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa consumida. Se generan también dos equivalentes reductores, en forma de NADH (el cual en condiciones anaeróbicas necesita ser reoxidado a  $\text{NAD}^+$  para que la ruta siga actuando).

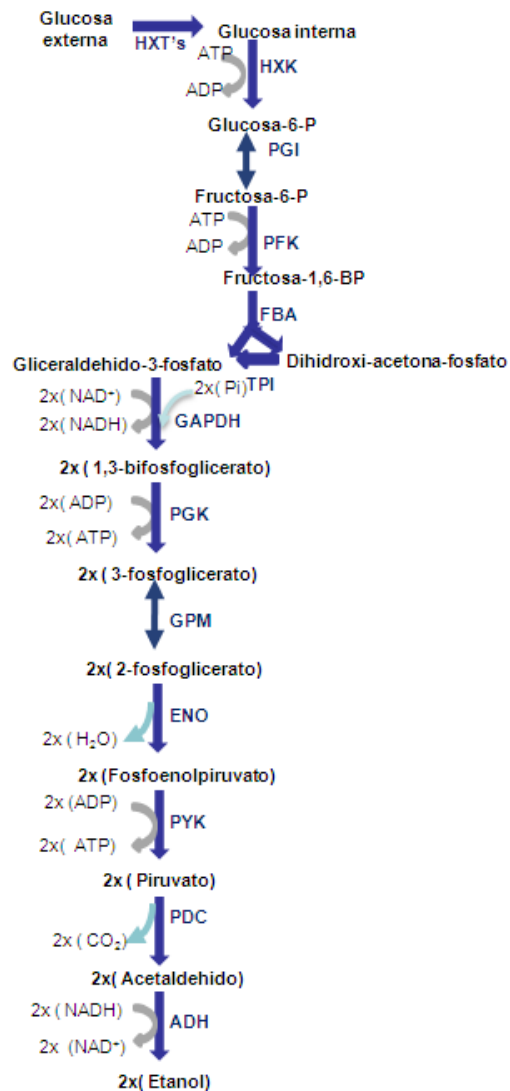
El piruvato constituye un punto importante de ramificación metabólica. En los organismos aeróbicos o tejidos, bajo condiciones aeróbicas la glicólisis es la primera etapa de la degradación completa de la glucosa. El piruvato se oxida a  $\text{CO}_2$  con la pérdida del grupo carboxilo para producir el grupo acetil a acetil-coenzima A, posteriormente el grupo acetil es oxidado completamente a  $\text{CO}_2$  por el ciclo del ácido cítrico. Los electrones que se forman de estas oxidaciones son pasados al  $\text{O}_2$  a través de una cadena de acarreadores en la mitocondria para formar  $\text{H}_2\text{O}$ . Esto lleva a la síntesis de ATP en la mitocondria.

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



## CONVERSIÓN DE PIRUVATO A ETANOL. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La alta capacidad de *Saccharomyces cerevisiae* para degradar los azúcares a etanol y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) ha sido utilizada por los humanos por varios miles de años para la fermentación de bebidas alcohólicas y para hacer pan.



**Figura 1.** Vía glicolítica en eucariontes como evento en la obtención de energía. HXK, hexocinasa; PGI, fosfoglucosa isomerasa; PFK, fosfofructocinasa; FBA, fructosa-bifosfato aldolasa; TPI, triosafosfato isomerasa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa; PGK, 3-fosfoglicerato cinasa; GPM, fosfoglicerato mutasa; ENO, enolasa; PYK, piruvato cinasa; PDC, piruvato descarboxilasa; ADH, alcohol deshidrogenasa.

*Saccharomyces cerevisiae* y las levaduras cercanas filogenéticamente son capaces de convertir el piruvato bajo condiciones de alta concentración de glucosa y de manera independiente a la concentración de oxígeno, en etanol y CO<sub>2</sub> por la llamada fermentación alcohólica que es una ruta de dos pasos la cual comienza con la descarboxilación del piruvato a acetaldehído, catalizada por la piruvato descarboxilasa. Finalmente la síntesis de etanol se obtiene mediante la reducción del acetaldehído (que depende del NADH) catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa.

La producción industrial de etanol ha adquirido una gran importancia cuando se consideran dos aspectos como lo son: 1) la sustitución del petróleo por fuentes de energía renovables y, 2) la utilización de fuentes vegetales y de materiales biológicos de desecho.

## **VÍA GLICOLÍTICA EN *Saccharomyces cerevisiae***

### **PRINCIPALES PUNTOS DE CONTROL DE FLUJO**

Debido a su importancia comercial e industrial, diversos estudios se han enfocado en entender la regulación de la vía glicolítica en *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo hasta la fecha no se han entendido a fondo los mecanismos que regulan el flujo glicolítico y la producción de etanol. La comprensión de la regulación de esta vía permitirá la construcción de cepas modificadas genéticamente con mayor velocidad de producción de etanol, lo que reduciría los costos de producción y haría más viable la utilización de este alcohol como combustible alternativo

([http://www.sener.gob.mx/webSener/res/PE\\_y\\_DT/pub/Biocombustibles\\_en\\_Mexico\\_Estudio\\_Completo.pdf](http://www.sener.gob.mx/webSener/res/PE_y_DT/pub/Biocombustibles_en_Mexico_Estudio_Completo.pdf)). Actualmente se sabe que el incremento en la transcripción de los genes que codifican para las enzimas de la glicólisis no provoca un aumento en la producción de etanol (Schaaf I., *et al*, 1989). Se considera que el principal mecanismo de control del flujo es la modulación de la actividad enzimática mediada por sustratos, productos o metabolitos efectores (Daran-Lapujade P., *et al* 2007). Sin embargo no se han identificado las enzimas particulares que limitan el flujo de la vía *in vivo*.

Durante mucho tiempo se propusieron a las enzimas hexocinasa, fosfofructocinasa y piruvato cinasa (que catalizan pasos irreversibles en la vía glicolítica) como puntos importantes del control del flujo glicolítico (Larsson C, *et al* 2000; Blázquez MA, *et al* 1994, Van Den Brink J, *et al* 2008). Estas enzimas están sujetas a inhibición *in vivo*, la HXK se inhibe por trehalosa 6-fosfato (Blázquez MA, *et al* 1993), mientras que la PFK-1 y la PK se inhiben por ATP (Larsson C, *et al* 2000; Reibstein D, *et al* 1986). Probablemente esas inhibiciones estén limitando el flujo glicolítico. Sin embargo en cepas en las que, de manera independiente, se elimina la inhibición de la HXK o de la PFK-1, no aumenta la velocidad de producción de etanol (Bonini BM, *et al* 2003; Rodicio R, *et al* 2000). Dichos resultados eran de esperarse si se toma en cuenta que es más probable que el control de flujo sea distribuido entre varios pasos, esto es, comúnmente es necesario incrementar la velocidad de más de una enzima para obtener un incremento en el flujo. De esta manera, otros grupos de trabajo sobre-expresaron formas endógenas de dichas enzimas y combinaciones de ellas y del resto de la

vía de manera simultánea (tanto de la parte alta de la vía como de la parte baja), el resultado tampoco fue exitoso (Tabla 1).

**Tabla 1.** Sobre-expresión de enzimas glicolíticas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Moreno, R. *et al*, 2005)

Enzima (s)	Actividad (Veces de sobre- expresión)	Flujo a etanol (%Control)	Referencia
HXK	13.9	107	Schaaf, I., et al, 1989
PFK-1	3.7	102	Schaaf, I., et al, 1989
PYK	8.6	107	Schaaf, I., et al, 1989
PDC	3.7	85	Schaaf, I., et al, 1989
ADH	4.8	89	Schaaf, I., et al, 1989
PFK-1 + PYK	5.6 + 1.3	107	Schaaf, I., et al, 1989
PDC + ADH	3.7 + 5.9	94	Schaaf, I., et al, 1989
GAPDH + PGK + PGM + ENO + PYK + PDC + ADH	1.4 + 1.7 + 16 + 4 + 10.4 + 1.08 + 1.4	121	Hauf, J., et al, 2000
GAPDH + PGK + PGM + ENO + PYK + PDC + ADH	1.5 + 1.4 + 3.4 + 1.5 + 2.5 + 1.1 + 1.2	94	Smits, HP., et al, 2000

Se ha reportado también que la regulación del flujo de la vía glicolítica ocurre mediante procesos que ocurren afuera de la vía glicolítica, como el transportador de hexosa (Van Den Brink J, *et. al*, 2008) el cual aún falta por ser explorado a fondo, aunque se sabe que es altamente importante para la dinámica de la glicólisis. (Reijenga KA *et al*, 2001)

Intentos para optimizar procesos metabólicos, mediante la sobre-expresión de enzimas que se piensa son importantes en la determinación de la velocidad de formación de un producto deseado, a menudo llevan a resultados negativos como

lo hemos observado con la sobre-expresión de enzimas glicolíticas para la producción de etanol en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se ha establecido que para lograr cepas sobre-productoras de manera exitosa es necesario hacer uso de varias modificaciones genéticas y bioquímicas de manera simultánea y no sólo de cambios en una sola enzima o un sólo gen. Es por tanto que se han planteado puntos importantes que deben tomarse en cuenta al construir una cepa sobre-productora de algún metabolito, algunos de ellos son los siguientes:

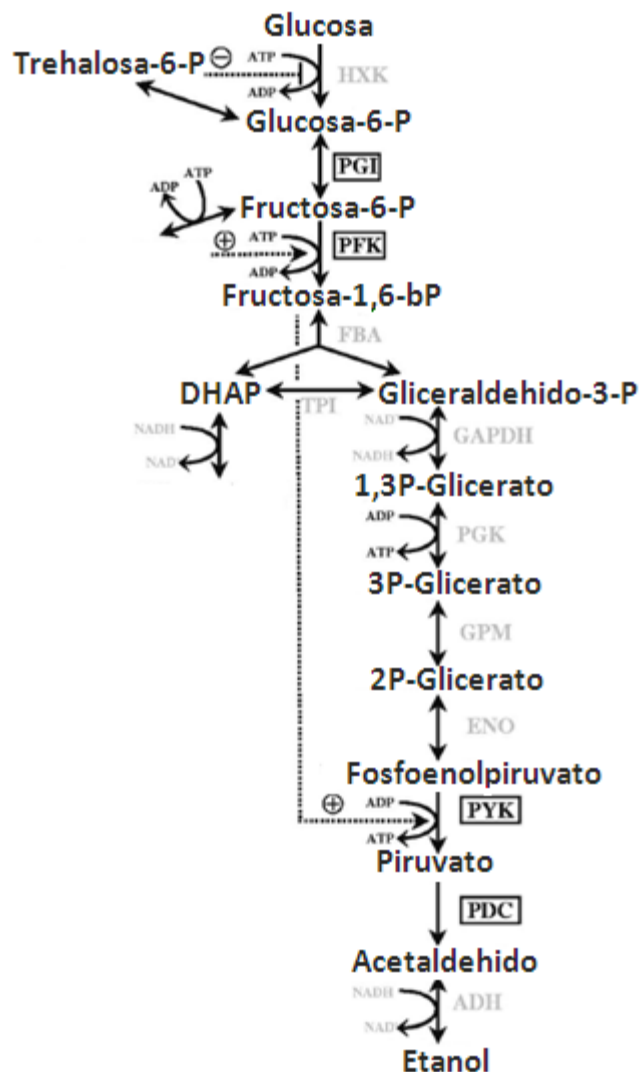
- Múltiples enzimas de la vía deben ser simultáneamente sobre-expresadas.
- Algunas de las enzimas sobre-expresadas deben contener mutaciones las cuales confieran insensibilidad a la inhibición por retroinhibición.
- Las fugas de la vía deben ser atenuadas o totalmente bloqueadas.
- Los transportadores que sacan de la célula al producto final deben ser sobre-expresados, de esta manera se atenúa la inhibición por producto final de las últimas reacciones.
- Las condiciones de cultivo deben ser optimizadas.

Es por esto que diversos grupos de investigación han utilizado diferentes estrategias de forma simultánea para obtener mejores resultados. Basándonos en esta idea, en este proyecto también se decidió utilizar dos estrategias simultáneamente para ver si estas dos modificaciones presentaban un efecto sinérgico sobre la velocidad de producción de etanol. Nuestro proyecto se enfocó en aumentar la demanda de ATP y en reducir el efecto de la inhibición

de la hexocinasa por trehalosa-6-fosfato en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

## **INHIBICIÓN DE LA ENZIMA HEXOCINASA II (Hxk2) POR TREHALOSA-6-FOSFATO EN *Saccharomyces cerevisiae***

La hexocinasa (HXK), cataliza la primera reacción de la vía glicolítica en *S. cerevisiae* la cual se encarga de fosforilar a la glucosa interna a glucosa 6-fosfato y es sometida a inhibición *in vivo* por trehalosa 6-fosfato (Tre6P) (Figura 2), a diferencia de la hexocinasa (glucocinasa) de mamíferos que es inhibida por su producto glucosa-6-fosfato (G6P) (Blázquez MA *et al*, 1994), la trehalosa-6-fosfato (Tre6P) inhibe competitivamente (respecto a la glucosa y fructosa) la fosforilación de la hexosa, siendo la mayor inhibición sobre la hexocinasa 2 con una  $K_i$  de 0.04mM; además de esta enzima, *S. cerevisiae* tiene otra isoenzima, la hexocinasa 1, con una inhibición mucho más débil con una  $K_i$  de 0.2mM, además de contar con una glucocinasa (Blázquez MA *et al*, 1993).



**Figura 2.** Vía glicolítica en *Sachharomyces cerevisiae*. Las líneas punteadas indican acciones de activación (+) e inhibición (-) de metabolitos sobre las enzimas HXX, hexocinasa; PGI, fosfoglicosa isomerasa; PFK, fosfofructocinasa; FBA, fructosa-bifosfato aldolasa; TPI, triosafosfato isomerasa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa; PGK, 3-fosfoglicerato cinasa; GPM, fosfoglicerato mutasa; ENO, enolasa; PYK, piruvato cinasa; PDC, piruvato descarboxilasa; ADH, alcohol deshidrogenasa (Joost van den Brink et al, 2008).

En *Saccharomyces cerevisiae*, la concentración intracelular de trehalosa-6-fosfato es de apenas 0.2mM la cual es suficiente para inhibir a la hexocinasa 2 mientras que, la glucocinasa no se inhibe a concentraciones superiores de 5mM de trehalosa-6-fosfato. (Larsson C, *et al*, 2000, Blázquez MA, *et al*, 1994).

Bonini *et al*, sustituyeron las hexocinasas 1 y 2 (ScHxk1 y ScHxk2) de *Saccharomyces cerevisiae* así como a la glucocinasa (ScGlk1) por la hexocinasa 2 insensible a trehalosa-6-fosfato de *Schizosaccharomyces pombe* (SpHxk2), también expresaron a la SpHxk2 en una cepa silvestre de *S. cerevisiae*. Ellos observaron que la hexocinasa 2 (Hxk2) de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* expresada en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es insensible a la inhibición por trehalosa-6-fosfato aún a concentraciones de 3mM, del mismo modo que es insensible a glucosa-6-fosfato (Glu6P). Encontraron que la cepa que sobre-expresaba a la SpHxk2 mostraba una producción de etanol y consumo de glucosa similar a los obtenidos en la cepa silvestre. Después de 4h de incubación en glucosa, más del 50% de la glucosa fue consumida y cerca de 2mg/mL (45mM) de etanol fue producido por estas cepas (Bonini BM *et al*, 2003).

### **BIOSÍNTESIS DE LA TREHALOSA EN *Saccharomyces cerevisiae***

La trehalosa es un disacárido no reductor compuesto de dos unidades de glucosa unidas mediante un enlace  $\alpha$ -D-glucopiranosil-[1,1]- $\alpha$ -D-glucopiranosido. El enlace  $\alpha,\alpha$ -1,1 conecta los dos extremos reductores de los residuos de glucosa anulando su poder reductor. Se encuentra presente en diversos organismos incluyendo bacterias, levaduras, insectos y plantas. Las células de los hongos pueden

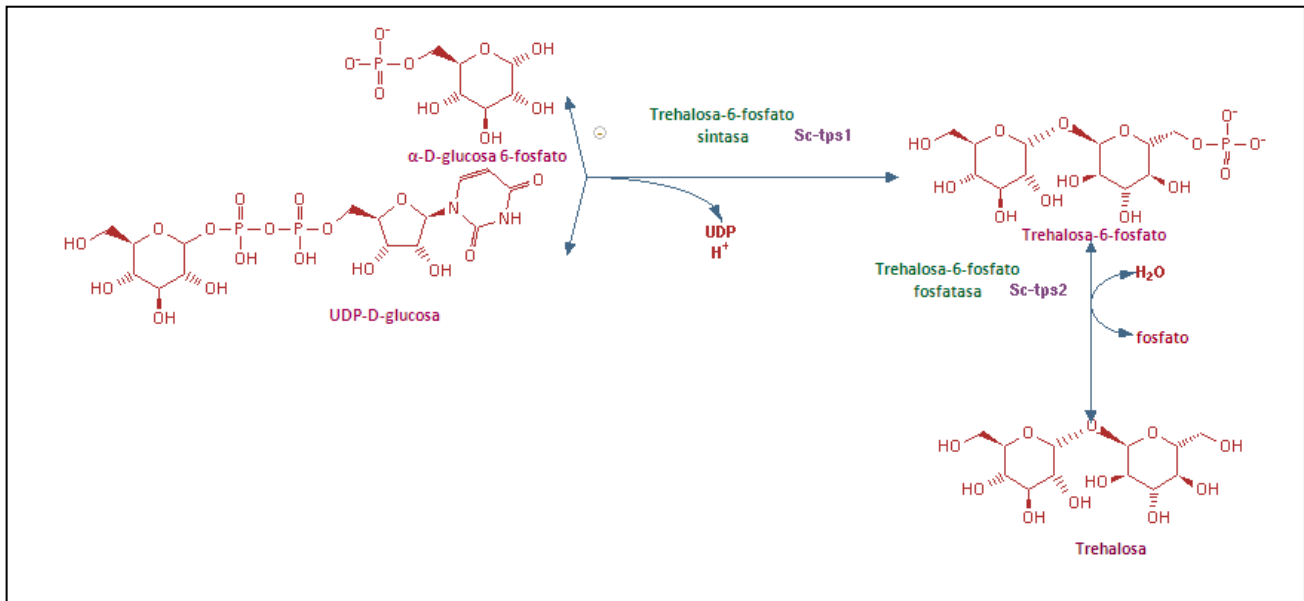


acumular este disacárido hasta por encima del 15% del peso seco de la célula dependiendo de las condiciones de crecimiento y del estrés del medio ambiente (Jules M, *et al*, 2008). La trehalosa actúa como protector (de proteínas y membranas biológicas) ante el daño celular causado por condiciones adversas y juega un papel muy importante como carbohidrato de reserva en *Saccharomyces cerevisiae*. De igual forma acumula glucógeno como otro tipo de azúcar de reserva (Francois J and Parrou JL, 2001).

La biosíntesis de la trehalosa fue elucidada por Leloir y Cabib en el año de 1958, fueron ellos quienes postularon en *S. cerevisiae* una vía de dos pasos en la que intervienen las enzimas trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) y la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP) (Cabib E and Leloir LF, 1958). Dichas enzimas están codificadas por los genes *TPS1* y *TPS2*, respectivamente. Además cuenta también con una subunidad reguladora codificada por los genes *TSL1* y *TSP3* que estabilizan al complejo de proteínas (Francois J and Parrou JL, 2001; Hounsa CG *et al*, 1998).

La trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) cataliza la transferencia de glucosa del nucleótido del azúcar uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa) a glucosa-6-fosfato para producir trehalosa-6-fosfato y UDP. Posteriormente, la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP) defosforila a la trehalosa-6-fosfato para obtener trehalosa libre y fosfato inorgánico (Figura 3) (Cabib E and Leloir LF, 1958; Eastmond PJ and Graham IA, 2003; Hounsa CG *et al*, 1998).

A esta vía se le conoce como TPS/TPP y también se encuentra en bacterias donde se le conoce como la vía OtsA/OtsB.



**Figura 3.** Biosíntesis de la trehalosa en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. BIOCYC Database collection (<http://biocyc.org/metacyc/index.shtml>)

### DEMANDA DE ATP POR EFECTO DEL USO DE BENZOATO DE SODIO

El control del flujo glicolítico en células vivas ha sido investigado durante décadas.

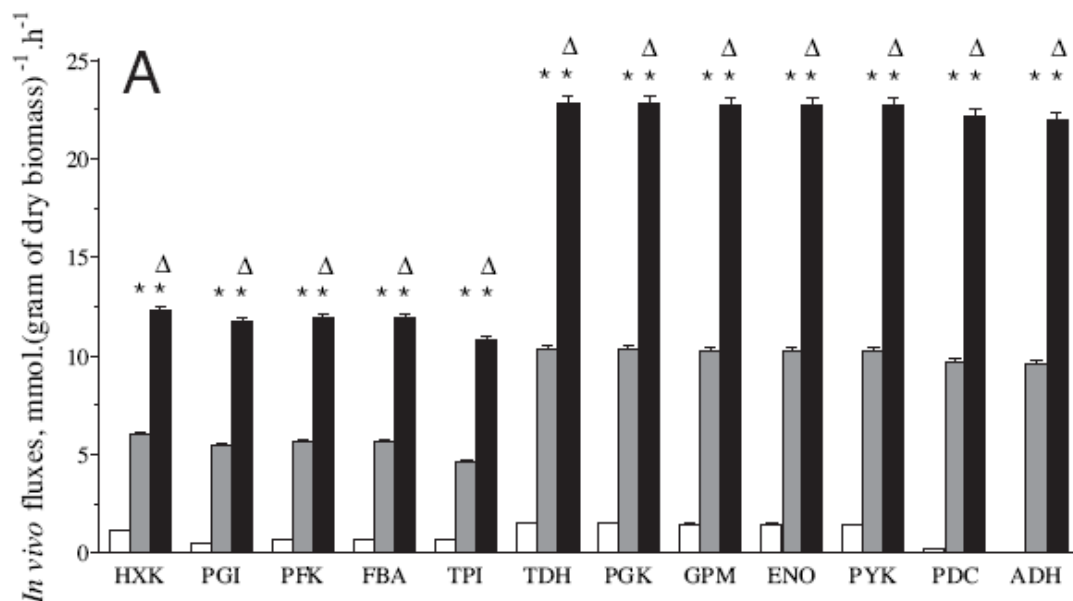
Muchos se han preguntado cómo es el control de flujo a través de la vía glicolítica.

Se ha propuesto que el control de flujo puede ser compartido entre varias enzimas en una vía y que el control puede también residir afuera de la vía, por ejemplo, en procesos que consumen el ATP generado en la glicólisis, esto es, la demanda de ATP.

En *Escherichia coli*, se ha demostrado experimentalmente que la mayoría del control de flujo glicolítico (mayor al 75%) reside en la demanda de ATP (Koebmann BJ *et al*, 2002) con un coeficiente de flujo de control (FCC) de 0.96 (Koebmann BJ *et al* 2002b).

Para incrementar el flujo glicolítico en *Saccharomyces cerevisiae*, se han utilizado ácidos débiles como benzoato. Se ha observado un incremento de hasta dos veces en los flujos a través de las enzimas glicolíticas en un medio anaeróbico al

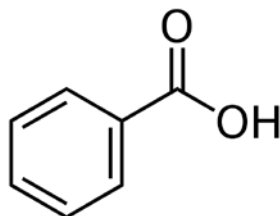
que se le añadió 2mM de ácido benzoico (Figura 4) (Daran-Lapujade P *et al*, 2007).



**Figura 4.** Medición de flujos a través de las enzimas glicolíticas en medio aerobio (barras blancas), medio anaerobio (barras grises) y medio anaerobio más benzoato de sodio 2mM (barras negras) (Daran LP *et al*, 2007)

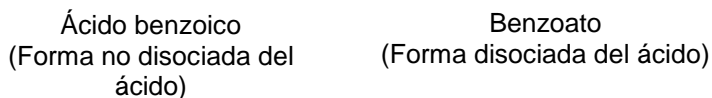
## ÁCIDO BENZOICO

El ácido benzoico es un ácido carboxílico aromático que tiene un grupo carboxilo unido a un anillo de benceno (Figura 5).



**Figura 5.** Forma estructural del ácido benzoico.

En solución, el ácido benzoico alcanza un equilibrio de la forma no disociada y disociada del ácido dependiente del pH (Figura 6).



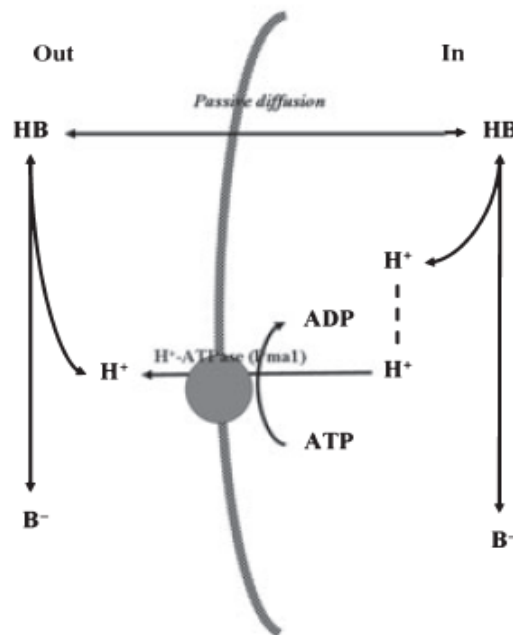
**Figura 6.** Equilibrio entre la forma no disociada y disociada del ácido benzoico.

Es un ácido orgánico débil que ha sido uno de los más utilizados como conservador junto con otros ácidos como ácido sórbico, ácido acético, ácido propiónico y ácido láctico en la prevención del deterioro microbiano en los alimentos a gran escala así como en la producción de bebidas (Hazan R *et al*, 2004; Kresnowati MT *et al*, 2008).

Se sabe que el ácido benzoico no es metabolizado por las células de las levaduras, razón por la cual se ha utilizado como objeto de estudio para perturbar a estas células.

Este compuesto existe en su forma no disociada bajo condiciones de medio ácido, particularmente a valores menores que los de su constante de disociación ( $pK_a = 4.19$ ). En este estado puede difundir fácilmente las membranas celulares ya que en su estado disociado es comúnmente impermeable. Una vez que difunde al citosol en donde el pH intracelular es más alto (pH de 6-7), se disocia en su anión con la liberación de un protón, generando su base conjugada. Esto resulta en una acidificación intracelular la cual afecta la homeostasis del metabolismo e inhibe el crecimiento de microorganismos. Esta caída del pH citosólico puede ser neutralizada por la acción de la  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática (Pma1), la cual hidroliza ATP para bombear protones afuera de la célula (Figura 7). Es por

tanto que la célula acelera su catabolismo para generar más energía para compensar la fuga de ATP para exportar benzoato y protones (Warth AL, 1991; Verduyn C *et al*, 1992; Henriques M *et al*, 1997; Pearce AK *et al*, 2001; Hazan R *et al*, 2004; Kresnowati MT *et al*, 2008). *Saccharomyces cerevisiae* responde a este proceso de consumo de energía conduciendo a una disminución en la producción de biomasa, pero a un aumento en su capacidad fermentativa y por tanto, en el flujo glicolítico y en la producción de etanol. La tasa de crecimiento se reduce probablemente por que la energía utilizada para mantener el pH intracelular no se encuentra disponible para el crecimiento. Sin embargo, se ha demostrado que las células de *S. cerevisiae* pueden adaptarse a los ácidos débiles mediante un transportador exportador de benzoato (Pdr12; Piper *et al.*, 1998) por lo que el crecimiento puede reanudarse después de un tiempo de recuperación.



**Figura 7.** Esquema de la respuesta general de *Saccharomyces cerevisiae* al ácido benzoico.

## HEXOCINASA 2

### REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GENES

*Saccharomyces cerevisiae* utiliza una variedad de fuentes de carbono para su crecimiento, pero la glucosa y las hexosas relacionadas como la fructosa son usadas preferentemente. Cuando uno de estos azúcares está presente, las enzimas requeridas para utilizar fuentes alternativas de carbono como maltosa o galactosa son sintetizadas en menor porcentaje o no lo son (Gancedo JM 1998). Para fosforilar a la glucosa, *S. cerevisiae* cuenta con tres enzimas: la glucocinasa codificada por el gen *GLK1*, la hexocinasa 1 codificada por el gen *HXK1* y la hexocinasa 2 codificada por el gen *HXK2* (Ma H and Botstein D, 1989; Diderich JA *et al*, 2001; Rodríguez A *et al*, 2001). Previo a la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato está la captación de glucosa a través de la membrana llevada a cabo por miembros de la familia de los transportadores de hexosa. Se han identificado al menos 20 genes *HXT* que codifican para estos transportadores de baja (*HXT1* y *HXT3*), intermedia (*HXT2* y *HXT4*) y alta (*HXT6* y *HXT7*) afinidad (Petit TD *et al*, 2000; Rossi G *et al*, 2010).

La hexocinasa 2 juega el papel más importante en la fosforilación de la glucosa *in vivo* debido a que es la isoenzima que predomina durante el crecimiento de *S. cerevisiae* en glucosa. Se considera una fosfoproteína y puede existir *in vitro* en dos isoformas, una monomérica y una dimérica, las cuales tienen diferentes afinidades por la glucosa (Randez-Gil F *et al*, 1998).

La hexocinasa 2 es importante en la regulación de la represión de la glucosa, esto es, que las células de la levadura se adaptan para la fermentación de la glucosa reprimiendo un gran número de genes a nivel de la transcripción. El gen *HXK2* se expresa cuando las células de *S. cerevisiae* están creciendo en un medio fermentable usando glucosa, fructosa o manosa como fuente de carbono. Sin embargo, después de un cambio de las células a una fuente de carbono no fermentable, el gen *HXK2* se reprime y otros genes se desreprimen.

La transcripción de genes que codifican para la invertasa *SUC2*, genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de la galactosa *GAL*, genes *MAL* que codifican proteínas envueltas en el metabolismo de la maltosa, el gen *HXK1* que codifica para la hexocinasa 1 y genes que codifican enzimas de la vía alternativa del glioxilato, del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), y de la gluconeogénesis son reprimidos en presencia de glucosa.

Sin embargo, en mutantes de la hexocinasa 2, la síntesis de las enzimas hexocinasa 1, de la invertasa, de la maltasa, de la malato deshidrogenasa, de la galactocinasa, de la citocromo c reductasa y de la citocromo c oxidasa ya no son reprimidas por la glucosa.

Hxk2 es activadora transcripcional de genes glicolíticos y del transporte. Durante el crecimiento exponencial en glucosa una cepa *hxk2* nula exhibe una alta afinidad de transporte de hexosa asociado con una elevada transcripción de genes *HXT2* y *HXT7*, que codifican transportadores de alta afinidad y una disminución de la expresión de los genes *HXT1* y *HXT3* que codifican transportadores de baja afinidad (Petit TD et al, 2000).

La hexocinasa 2 tiene una doble localización en el núcleo y en el citosol (Randez-Gil F *et al*, 1998). La localización nuclear de la Hxk2 es necesaria para la señalización de la represión de glucosa del gen *SUC2* y de los genes *HXK1* y *GLK1* (Herrero P *et al*, 1998; Diderich JA *et al*, 2001; Rodríguez A *et al*, 2001).

El fenotipo de una cepa que tiene mutaciones nulas en el gen *HXK2* tiene una pérdida completa de la represión catabólica así como pérdida en la actividad de la hexocinasa 2 (Hxk2) (Ma H and Botstein D, 1989).

### **METABOLISMO DE *Saccharomyces cerevisiae***

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura que tiene flexibilidad metabólica, esto es, puede cambiar rápidamente su metabolismo de respiratorio a fermentativo en respuesta a la disponibilidad de oxígeno y de los azúcares fermentables. Esta característica es de mucha importancia debido a que puede incrementar su catabolismo y por tanto aumentar la productividad.

Durante el crecimiento aeróbico en fuentes fermentables de carbono, *Saccharomyces cerevisiae* prefiere la fermentación frente a la respiración.

En *S. cerevisiae* la represión de glucosa conduce a la ocurrencia de un crecimiento diaúxico aeróbico en glucosa (Diderich JA *et al*, 2001; Otterstedt K *et al*, 2004). El perfil de la producción de dióxido de carbono y el consumo de oxígeno durante este tipo de crecimiento (respirofermentativo) es característico que se presente en dos fases. Primero, la glucosa se cataboliza fermentativamente a dióxido de carbono y etanol y pequeñas cantidades de otros subproductos como acetato, glicerol y piruvato. Parte de esa azúcar es



catabolizada respiratoriamente o utilizada para producir biomasa. Finalmente, el etanol y otros productos fermentativos que fueron producidos durante el crecimiento en glucosa son consumidos a dióxido de carbono y agua y parcialmente incorporado en biomasa.

El comportamiento de un metabolismo totalmente respiratorio es un poco diferente al comportamiento de crecimiento diáuxico, exhibe un único paso de crecimiento en donde la cantidad de etanol y otros subproductos que se producen es mínima durante toda la fase de crecimiento y la glucosa es consumida principalmente para la producción de biomasa. El crecimiento oxidativo produce más moléculas de ATP por molécula de glucosa que el crecimiento fermentativo.

A este proceso de producir etanol a partir de glucosa bajo condiciones de crecimiento aerobias se conoce como “Crabtree effect” (Diderich JA *et al*, 2001).

En el crecimiento fermentativo bajo condiciones anaerobias gran parte del consumo de glucosa es para la producción de etanol.

Las vías metabólicas del metabolismo central del carbono son básicamente idénticas entre diferentes especies de levaduras, lo cual sugiere que estos microorganismos podrían constituir un grupo homogéneo metabólico. Sin embargo, los mecanismos de absorción de nutrientes, el número diferente de isoenzimas y más importante la regulación de la fermentación y respiración difieren sustancialmente (Flores CL *et al*, 2000) esto hace que las levaduras sean un grupo metabólico altamente heterogéneo y complejo.

## **HIPÓTESIS**

En una cepa de *Sacharomyces cerevisiae*, en la que se sobreexpresa una forma insensible a inhibición por trehalosa-6-P de la enzima hexocinasa tipo dos y, de manera simultánea se incrementa la demanda de ATP, la velocidad de producción de etanol aumentará.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Construir una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que sobre-expresa una forma de hexocinasa insensible a inhibición por trehalosa 6-fosfato y estudiar el efecto de benzoato de sodio en el medio, sobre la velocidad de producción de etanol

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Sobre-expresión de SpHXK2: Clonar el gen SpHXK2 en un plásmido multicopia (pRS426), bajo la presencia del promotor constitutivo HXT7t y del terminador HXT7 y transformar el plásmido resultante en una cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741).

- Comparación de los niveles de transcripción del gen SpHXK2 entre la cepa silvestre y la cepa que sobre-expresa el gen SpHXK2.
- Determinación de la velocidad de producción de etanol y la velocidad de crecimiento en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de benzoato de sodio entre la cepa silvestre (BY4741/pRS426) y la cepa que sobre-expresa el gen SpHXK2 (BY4741/pDSpHXK2).
- Estudio de la cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* que tiene interrumpido al gen que codifica para la hexocinasa dos ( $hxc2\Delta$ /pRS426) mediante la determinación de la velocidad de producción de etanol y la velocidad de crecimiento en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de benzoato de sodio en comparación con la cepa silvestre (BY4741/pRS426).

## MATERIALES Y MÉTODOS

En la Tabla 2, se muestran las cepas que fueron utilizadas durante la realización de este proyecto.

**Tabla 2.** Características de las cepas utilizadas.

MICROORGANISMO	CEPA	CARACTERÍSTICAS
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BY4741	MaT a; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y04620 (hvk2 $\Delta$ )	BY47421; Mat a; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0, lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YGL253w::KanMX4
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	SP286	h+, ade6-M210, ura4-D18, leu1-32; haploide

## EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

Las células de *Schizosaccharomyces pombe* se cultivaron en medio YES (ver apéndice) para extraer DNA genómico. Las de *Saccharomyces cerevisiae* se cultivaron en medio mínimo MMHML (ver apéndice) durante toda la noche a 30°C en agitación (250rpm). Al día siguiente se recolectaron por centrifugación a 3000rpm por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y el botón de células se resuspendió en agua estéril. Dichas células se transfirieron a un microtubo de 1.5mL nuevo y estéril. Nuevamente se colectaron por centrifugación (13000rpm, 10s) a las cuales se agregó 200 $\mu$ L de una solución de lisis: tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM pH 8 y Na-EDTA 1mM. Posteriormente se

añadieron 200µL de una mezcla de fenol-cloroformo en partes iguales y se añadieron 0.3g de perlas de vidrio (710-1,180 µm diámetro). Se agitó la mezcla en vortex a la máxima velocidad durante 5 minutos y se agregaron 200µL de buffer amortiguador TE. Se centrifugó durante 5 minutos a 14000rpm en una microcentrífuga recuperando después la fase acuosa teniendo cuidado de no tocar las otras fases. Se repitió el lavado con fenol-cloroformo y la centrifugación sin perlas de vidrio dos veces más para un total de tres lavados. Con el fin de precipitar el DNA, se agregó 1mL de etanol al 100% mezclando por inversión 5 veces. Se centrifugó a 14000rpm durante 4 minutos y se desechó el sobrenadante. El pellet que se obtuvo se resuspendió en 400µL de TE y se agregaron 10µL de RNAsa (10mg/mL). Se incubó durante 30 minutos a 37°C y se agregaron 10µL de acetato de amonio 4M más 1mL de etanol al 100% mezclando por inversión 5 veces. Se centrifugó a 14000rpm por 2 minutos y se desechó el sobrenadante. Se dejó secar el pellet por aproximadamente 30 minutos y se resuspendió con 50µL de agua estéril utilizando la punta de la pipeta. Se cargaron 1-3µL de muestra de DNA en un gel de agarosa 0.8% a 100 volts por 30 minutos y se visualizó en una cámara de UV.

## **DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS**

Para llevar a cabo el diseño de los oligonucleótidos fue necesario conocer la secuencia de DNA del gen de interés, la cual se extrajo de las bases de datos *Schizosaccharomyces pombe* GeneDB (<http://old.genedb.org/genedb/pombe/>) y *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>).

Con ayuda de un programa llamado “Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator” (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) se tomaron en cuenta los siguientes puntos para elegir la secuencia de los oligonucleótidos:

- La secuencia debe terminar con una o 2 bases G o C.
- La longitud debe ser de preferencia de 20-30 nucleótidos.
- El porcentaje de GC (%GC) debe ser mayor a 40 (entre 40 y 60). Los nucleótidos G y C deben estar distribuidos uniformemente a lo largo del oligonucleótido.
- La temperatura de fusión ( $T_m$ ) ajustada a sal debe ser de 65-70°C y no deben diferir los oligonucleótidos sentido y antisentido por más de 5°C.
- No debe haber puntas complementarias ni bases complementarias mayor a 3 bases.
- Para el oligonucleótido antisentido se utiliza la secuencia de la hebra complementaria.

En la Tabla 3 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

**Tabla 3.** Secuencia de los oligonucleótidos diseñados.

<b>NOMBRE</b>	<b>SECUENCIA</b>
<b>Sphxk2Fo <i>EcoRI</i></b>	5'-GCG CGC GAA TTC ATG GAG GCT AAT TTT CAA CAA GCTG-3'
<b>Sphxk2Re <i>EcoRI</i></b>	3'-GTT AAG GAA AAG AAA GGC TTG GCC TAA GGA ATT CGC GCGC-5'
<b>HXT7Fo</b>	5'-TAG GAA CAA TTT CGG GCC CCTG-3'
<b>HXT7Re <i>NheI</i></b>	3'-CAC AAA AAC AAA AAG TTT TTT TAA TTT TAA TCA AAA AGC TAG CGC GCGC-5'
<b>HXT7terFo <i>Clal</i></b>	5'-GCG CGC ATC GAT TTT GCG AAC ACT TTT ATT AAT TCA TGA TCA CGCTC-3'
<b>HXT7terRe <i>XhoI</i></b>	3'- CCA ATT TTG CCT GCA GAC CCA CGT CCT CGA GGC GCGC-5'
<b>TSphxk2Fo</b>	5'-TAT CTC GGT GAG CTT TTC CGCCG-3'
<b>TSphxk2Re</b>	3'-GAA CGT TCT GCT GAG AAT GTT CGTAA-5'
<b>ActScFo</b>	5'- GTT TTG CCG GTG ACGAC-3'
<b>ActScRe</b>	3'- CTT TCG GCA ATA CCT GGG-5'
<b>ActSpFo</b>	5'-TGA AAA CGC CGG TAT TCA TGA GGC-3'
<b>ActSpRe</b>	3'-GGA GCT AGG AGC AAG GGC TTG-5'

Los oligonucleótidos se utilizaron para amplificar los genes de interés por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### **AMPLIFICACIÓN DE DNA POR PCR**

Utilizando los oligonucleótidos pertinentes y con el DNA genómico de *Schizosaccharomyces pombe* o de *Saccharomyces cerevisiae* como plantillas, se prosiguió a amplificar los genes de interés utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La mezcla de reacción se llevó a cabo de la siguiente forma:

H<sub>2</sub>O.....a 50µL

Buffer *pfu*.....5µL

MgSO<sub>4</sub>.....1.5mM

DNA genómico.....1µg aprox

Oligonucleótido sentido.....0.15nmol/µL

Oligonucleótido antisentido.....0.15nmol/µL

dNTP's..... 0.2mM

BSA.....0.001mg

DMSO..... 1µL

Enzima *Pfu* DNA polimerasa.....1µL

La reacción se llevó a cabo en un termociclador con el siguiente programa:

TEMPERATURA	TIEMPO	
95 °C	3 minutos	
95°C	30 segundos	} 35 ciclos
Temp. alineamiento	1 minuto	
72°C	2-3 minutos	
72°C	10 minutos	
4°C		

La temperatura de alineamiento, así como el tiempo de extensión cambiaban dependiendo del gen a amplificar. Se recomienda que la temperatura de alineamiento sea 5°C por debajo de la tm ajustada a sal recomendada



(<http://www.basic.northwestern.edu/biotoools/oligocalc.html>). El tiempo de extensión debe ser proporcional al tamaño del gen, esto es, si el gen pesa 1kb el tiempo recomendado será de 1 minuto de extensión.

### **VISUALIZACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR POR ELECTROFORESIS**

Después de amplificar el gen de interés por medio de PCR, se debe verificar que el producto corresponda con el gen que deseamos clonar. Esto se logró mediante electroforesis. Se cargó el producto de PCR en un gel de agarosa 0.8% con bromuro de etidio ( $6 \times 10^{-4}$  mg/mL) y simultáneamente se cargó en el mismo gel un marcador de peso molecular de 1kb DNA plus ladder (Invitrogen) con el fin de conocer el tamaño de cada uno de los fragmentos de DNA que se amplificaron. Se les añadió a cada muestra colorante de cargado 5X (0.25% azul bromofenol, 0.25% xilen-cianol, 30% glicerol). El gel se colocó en una cámara de electroforesis la cual contenía buffer TBE 0.5X (44.6mM Tris, 0.5mM EDTA y 45mM ácido bórico) y se aplicó una corriente de 100 volts. Debido a que el bromuro de etidio se intercala entre las bases del DNA y fluoresce al ser expuesto a luz UV, se hizo uso de un transiluminador con luz UV para observar el resultado.

### **PURIFICACIÓN DEL GEN AMPLIFICADO. PURIFICACIÓN DEL GEL**

La purificación de fragmentos de DNA es una técnica muy común utilizada en biología molecular con diversas aplicaciones como clonación, secuenciación, digestión con enzimas de restricción y otras manipulaciones enzimáticas. Para esto, se utilizó el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega), el cual está

diseñado para purificar fragmentos de DNA provenientes de geles de agarosa o bien del producto de PCR directo de la reacción de amplificación. En este caso se cortó la banda del gel correspondiente al fragmento de DNA del gen en estudio con ayuda del transiluminador de luz UV en modo de baja intensidad para no dañar la molécula de DNA. Se purificó siguiendo el protocolo que consiste en disolver primero el gel en presencia de isotiocianato de guanidina (Membrane Binding Solution). Posteriormente el DNA se aisló mediante centrifugación haciendo que la banda del gel disuelto pasara a través de una membrana de silica quedando el DNA adherido a ésta. Se hicieron un par de lavados a los fragmentos de DNA unidos a la membrana con una solución llamada Membrane Wash Solution y finalmente se eluyó el DNA en agua.

Dicho procedimiento toma aproximadamente 15 minutos, dependiendo del número de muestras a procesar y se requiere sólo de una microcentrífuga.

## **LIGACIÓN A VECTOR pGEM T-easy**

### **ADICIÓN DE COLAS DE ADENINA**

Se adiciona un nucleótido de adenina en el extremo 3' de las cadenas del producto de PCR ya que la *pfu* DNA polimerasa posee actividad de edición y no tiene la actividad de transferasa terminal como ha sido demostrado para la *Taq* DNA polimerasa, la cual coloca un residuo de adeninas al extremo 3' del amplificado. La enzima *Pfu* DNA Polimerasa produce productos de amplificación con extremos romos. Los extremos romos pueden ser modificados mediante una segunda incubación con *Taq* DNA polimerasa, en presencia de dATP para facilitar

la clonación al vector pGEM-Teasy Vector System de Promega, el cual contiene nucleótidos de timidinas en sus regiones terminales de la molécula lineal.

Producto de PCR purificado.....	2µL
10X <i>Taq</i> Buffer.....	1µL
MgCl <sub>2</sub> 25mM.....	1µL
dATP 1mM.....	2µL
<i>Taq</i> DNA polimerasa.....	1µL (5U)
H <sub>2</sub> O desionizada.....	a 10µL

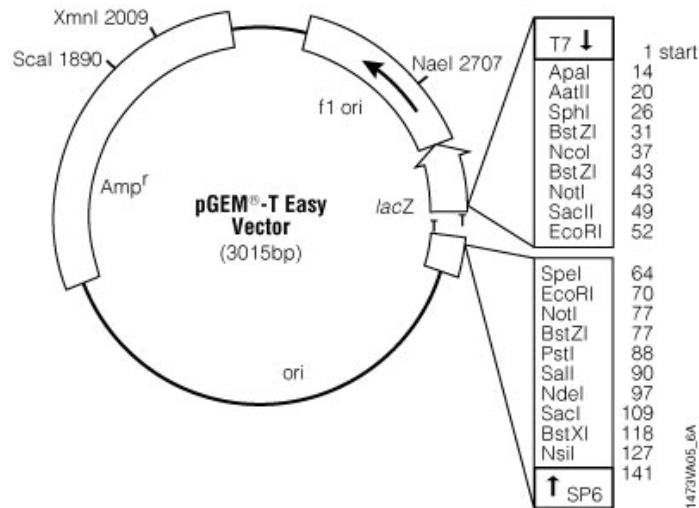
El tubo se mantuvo a 70°C durante 30 minutos.

### **LIGACIÓN A VECTOR pGEM T-easy**

pGEM T-Easy Vector Systems (Figura 8) es un vector lineal que facilita la clonación de productos de PCR al proveer de una sola extensión de timidina en el extremo 3'. Dicha extensión de timidinas en el sitio de inserción mejoran la eficiencia de la ligación de los productos de PCR evitando la recircularización del vector. Esta secuencia terminal de timidina es complementaria a los residuos no templados de adenina en el extremo 3' que son añadidos a los productos de DNA de doble hebra por la *Taq* DNA polimerasa.

La hebra complementaria de pares de bases que se forman entre el vector y el producto de PCR provee las condiciones para una reacción de ligación eficiente.

Además, contiene sitios de restricción para *EcoRI* y *NotI* que facilita la recuperación del gen para los siguientes pasos de la clonación y confiere resistencia a ampicilina a las células transformadas.



**Figura 8.** pGEM T-Easy

Se llevó a cabo la reacción de ligación al vector pGEM-Teasy vector (promega) una vez que el producto de PCR fue purificado y al cual se le añadió un nucleótido de adenina. Para cada reacción fue necesario preparar una mezcla previa de reacción la cual contenía 1µL del vector pGEM más 15µL de 2x Rapid Ligation Buffer (60mM Tris-HCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM DTT, 2mM ATP, 10% PEG, pH 7.8) dicha mezcla se dividió en partes iguales en el tubo problema y en el tubo control (no contiene producto de PCR). Se añadió a cada tubo T4 DNA ligasa para que se llevara a cabo la ligación y finalmente se dejó incubando a 4°C durante la noche.

Al día siguiente de la ligación al vector fue necesario llevar a cabo una transformación con bacterias competentes para seleccionar las transformantes positivas.

### **TRANSFORMACIÓN A BACTERIAS COMPETENTES *E. coli* DH5 $\alpha$**

Las células competentes son aquellas células que sufrieron algún tratamiento físico o químico y por lo tanto son capaces de permitir la entrada de DNA plasmídico foráneo a través de su membrana que es permeable.

Las células competentes son muy sensibles a cambios en la temperatura o a ruptura mecánica causada por el pipeteo, por lo tanto es muy importante trabajar gentilmente con estas bacterias. Se descongelaron en un baño de mezcla hielo-agua alícuotas de 200 $\mu$ L de bacterias competentes por cada transformación que se realizó. Se mezclaron con el DNA plasmídico a transformar (10 $\mu$ L de mezcla de ligación) y se incubaron en baño de hielo-agua por 30 minutos para que hubiera interacción con la membrana permeable de las células competentes y de esta forma el DNA que contiene el plásmido pudiera entrar a la célula. Pasado el tiempo, se llevó a cabo un choque térmico de la mezcla durante exactamente 45 segundos a 42°C para favorecer la entrada del DNA plasmídico y se transfirieron al baño de hielo-agua nuevamente durante 2 minutos de esta forma se cerraron los poros de la membrana quedando en el interior de las células competentes el DNA plasmídico que logró transformarse. Posteriormente, se agregó a cada célula transformada 800 $\mu$ L de medio LB y se incubaron a 37°C, durante 1 hora en agitación para que se recuperaran las bacterias del tratamiento térmico. Concluido

el tiempo de recuperación, se centrifugaron por 5 minutos a 3,500rpm, se eliminó el exceso de medio LB y se resuspendió con el resto con la punta de la pipeta. Finalmente se sembraron 100 $\mu$ L de bacterias en cajas de medio LB con ampicilina (100 $\mu$ g/mL) como antibiótico para la selección de colonias transformantes.

## **PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO MINI PREPS**

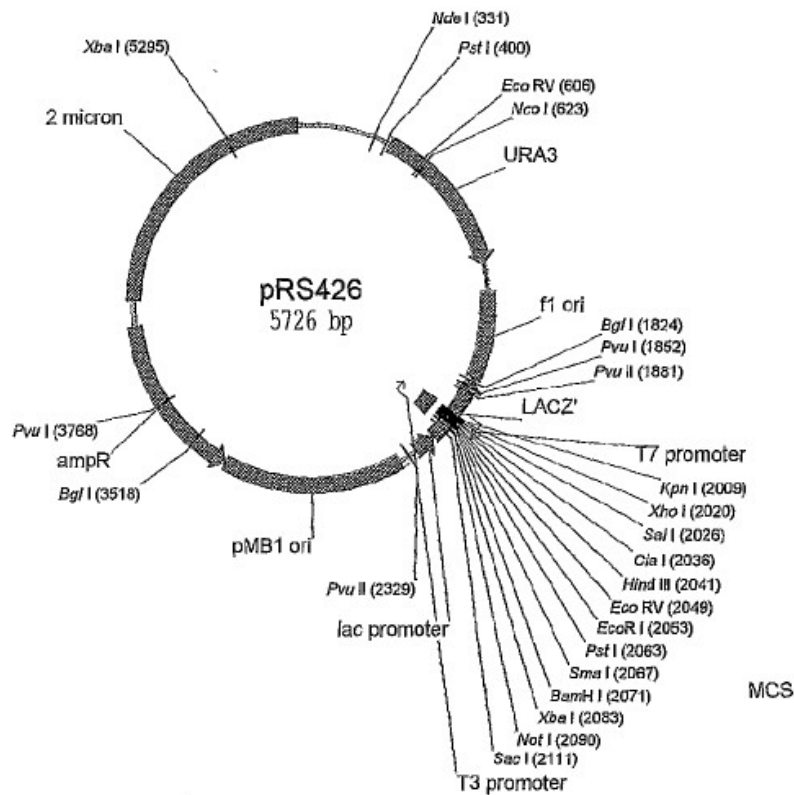
Las colonias que resultaron positivas en la transformación se inocularon en 5mL de medio LB con ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente se centrifugaron las células a 3500rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se continuó el protocolo para purificar el plásmido con el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Este sistema de purificación utiliza como base una membrana de silica en donde se retiene el DNA obteniendo DNA plasmídico altamente puro. El proceso comienza en resuspender el botón de células con una solución llamada Cell resuspension Solution que es una solución isotónica que se utiliza para resuspender, posteriormente se rompen con “Lysis Solution” y se tratan con “Alkaline Protease Solution” esto para inactivar las nucleasas. Se dejan incubar durante cinco minutos y se neutralizan con “Neutralization Solution”. Se centrifugan y se recupera el sobrenadante el cual contiene el plásmido, se hacen dos lavados con “2X Wizard Plus SV Minipreps Column Wash Solution” previamente diluido con etanol y finalmente se eluye la columna con “Nuclease Free Water” para recuperar el DNA plasmídico que fue retenido en la membrana.

## **DIGESTIONES CONFIRMATIVAS**

Es importante asegurarnos de la identidad del gen que se introdujo en el plásmido, para lo cual es necesario hacer digestiones con enzimas de restricción que nos den patrones específicos de digestión que concuerden con lo esperado para cada gen y de esta forma continuar con la clonación. Para cada reacción se utilizaron diferentes cantidades de DNA plasmídico purificado, se utilizó 0.5µL de enzima, 2µL de buffer específico para cada enzima de restricción (New England Biolabs), 2µL de albúmina de suero bovino o BSA (si era necesario). Se incubaron durante una hora en una incubadora a 37°C y transcurrido el tiempo cada muestra se cargó en un gel de agarosa 0.8% a 100 volts y siguiendo las indicaciones previamente mencionadas. También se verificó la orientación de cada gen en el plásmido utilizando enzimas de restricción.

## **LIGACIÓN A VECTOR MULTICOPIA PARA LEVADURAS pRS426**

pRS426 es un vector multicopia de levadura ya que contiene en su secuencia un sitio de replicación 2-micrones, cuenta también con el gen URA3 el cual permite la selección de levaduras transformadas, además de contar con un origen de replicación para bacterias y el gen de resistencia al antibiótico ampicilina (Figura 9) (Thomas WC, *et al* 1992).



**Figura 9.** Vector multicopia para levaduras pRS426

## Ligación

Buffer ligasa.....2µL  
 Ligasa.....1µL  
 Vector.....4µL  
 Inserto.....10µL  
 H<sub>2</sub>O.....a 20µL

## DESFOSFORILACIÓN

La desfosforilación es importante para evitar recircularización del vector y de esta manera aumentar la probabilidad de una ligación exitosa. Se utiliza fosfatasa alcalina de camarón o SAP (Shrimp alkaline phosphatase) (Fermentas) por sus



siglas en inglés, para catalizar la liberación de grupos fosfato- 5' de DNA, RNA o nucleótidos. También puede remover grupos fosfato de proteínas. La mezcla de reacción contiene al vector (300ng), 2  $\mu$ L de buffer de fosfatasa alcalina 10X, 11  $\mu$ L de SAP y agua para llevar a 20 $\mu$ L. Se incubó durante una hora a 37°C y posteriormente una segunda incubación a 65°C por 15 minutos para inactivar a la enzima.

### **CLONACIÓN DEL GEN SpHXK2 EN EL VECTOR MULTICOPIA PARA LEVADURAS pRS426**

Para obtener la clonación de la hexocinasa tipo dos de *Schizosaccharomyces pombe*, bajo el promotor constitutivo HXT7t y bajo el terminador HXT7, en un plásmido multicopia, lo primero que se llevó a cabo fue amplificar por medio de PCR el gen SpHXK2 utilizando los primers: Sphxk2Fo (5'-GCG CGC GAA TTC ATG GAG GCT AAT TTT CAA CAA GCTG-3') y Sphxk2Re (3'-GTT AAG GAA AAG AAA GGC TTG GCC TAA GGA ATT CGC GCGC-5') y el siguiente programa de temperaturas: Desnaturalización inicial de 5min a 95°C y después 35 ciclos de: 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 2 min de alineamiento a 58°C y 1.5 min de extensión a 72°C, seguidas por una extensión final de 10 min a 72°C, posteriormente se clonó en el vector pGEM-T Easy Vector y se subclonó con *EcoRI* al vector pRS426. Se verificó con *BamHI* la orientación del gen en el vector.

Por otro lado, se amplificó el gen que codifica al promotor HXT7 (PHXT7) utilizando los primers: HXT7Fo (5'-TAG GAA CAA TTT CGG GCC CCTG-3') y

HXT7Re (3'-CAC AAA AAC AAA AAG TTT TTT TAA TTT TAA TCA AAA AGC TAG CGC GCGC-5') y el siguiente programa de temperaturas: Desnaturalización inicial de 5min a 95°C y después 35 ciclos de: 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 1 min de alineamiento a 58°C y 1 min de extensión a 72°C, seguidas por una extensión final de 10 min a 72°C. Posteriormente, dicho gen se clonó en el vector pGEM-T Easy vector y se verificó su orientación con las enzimas de restricción *SacI* y *NheI*.

Para subclonar al promotor PHXT7 en el vector pRS426 con el ORF SpH XK2, se llevó a cabo una ligación *SacI-NotI*. Se verificó la orientación del promotor PHXT7 con *SacI* y *NheI* así como del promotor PHXT7 con el ORF SpH XK2 (PHXT7-SpH XK2) con *SacI* y *XhoI* en el vector pRS426.

Se amplificó también el gen que codifica para el terminador HXT7 (HXT7ter) utilizando los primers : HXT7terFo-*Clal* (5'-GCG CGC ATC GAT TTT GCG AAC ACT TTT ATT AAT TCA TGA TCA CGCTC-3') y

HXT7terRe-*XhoI* (3'- CCA ATT TTG CCT GCA GAC CCA CGT CCT CGA GGC GCGC-5') y el siguiente programa de temperaturas: Desnaturalización inicial de 5min a 95°C y después 35 ciclos de: 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 1 min de alineamiento a 58°C y 1 min de extensión a 72°C, seguidas por una extensión final de 10 min a 72°C. Finalmente se clonó con *Clal-XhoI* en el vector pRS426 con el promotor PHXT7 y el ORF SpH XK2 y se verificó su orientación con *HindIII* y *XhoI*.

Al plásmido resultante se le llamó pDSpH XK2.

## **SECUENCIACIÓN**

El vector pDSpHxK2 se envió a secuenciación automática utilizando los oligonucleótidos T3Promotor y T7Promotor así como con los oligonucleótidos Sphxk2Fo (5'-GCG CGC GAA TTC ATG GAG GCT AAT TTT CAA CAA GCTG-3') y Sphxk2Re (3'-GTT AAG GAA AAG AAA GGC TTG GCC TAA GGA ATT CGC GCGC-5') (los cuales flanquean nuestra construcción) en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. La secuencia resultante se comparó con la secuencia identificada para cada gen en el banco de secuencias GDB. De esta forma nos aseguramos que en la construcción no hubiera mutaciones, deleciones o inserciones introducidas por el método de la PCR.

## **TRANSFORMACIÓN A LEVADURAS**

Se preparó un pre-cultivo con una colonia aislada de la cepa a tratar y se incubó a 30°C en agitación en medio YPD. Al día siguiente de la transformación se utilizó dicho pre-cultivo para inocular 50mL de medio YPD en una densidad óptica de 0.25 a 600nm. El cultivo se incubó a 30°C en agitación hasta que alcanzara una densidad óptica de 0.5-0.6. Alcanzada dicha densidad óptica, se prosiguió a centrifugar el cultivo a 300rpm por 5 minutos a temperatura ambiente para colectar las células. Se resuspendió el pellet en 40mL de agua estéril y se centrifugó nuevamente a 3000rpm por 5 minutos a temperatura ambiente para colectar las células lavadas. Éstas se resuspendieron en 1mL de agua estéril y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5mL estéril, en donde se centrifugaron a 14000rpm por 5

segundos, eliminando el sobrenadante. Posteriormente se lavaron con 1mL de TE/LiOAc (ver apéndice) recién preparado y se resuspendieron en 200 $\mu$ L de TE/LiOAc. Se colocaron 50 $\mu$ L de células en un tubo eppendorf de 1.5mL estéril para cada muestra a transformar. Al tubo problema se le agregaron 10 $\mu$ L de DNA acarreador 10mg/mL (DNA de esperma de salmón previamente hervido e incubado en hielo durante 5 minutos) y 7 $\mu$ L de DNA plasmídico. También se hicieron dos controles, un tubo sin DNA acarreador ni DNA plasmídico y otro tubo sólo con DNA acarreador, esto con el objetivo de verificar que se haya llevado a cabo de manera correcta la transformación. Se mezcló cada tubo con la pipeta y se agregó a cada uno 300 $\mu$ L de PEG/TE/LiOAc (ver apéndice) al 45% recién preparado, se mezcló nuevamente. Se incubaron a 30°C con agitación por 30 minutos y después se sometieron a choque térmico por 15 minutos a 42°C, invirtiendo los tubos cada 3 minutos. Concluido el tiempo de incubación, se centrifugaron por 5 minutos a 3,500rpm, se eliminó el exceso de reactivos y se resuspendieron con el resto con la punta de la pipeta. Finalmente se sembraron 100 $\mu$ L de cada tubo de transformación en cajas de medio mínimo (MMHML).

En la tabla 4 se muestran las transformaciones que se llevaron a cabo.

**Tabla 4.** Descripción de las células transformadas.

<b>CEPA</b>	<b>PLÁSMIDO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
<b>BY4741</b>	pRS426	Multicopia
<b>BY4741</b>	pDSpHXK2	Multicopia con el gen SpHXK2
<b>Y04620</b>	pRS426	Multicopia
<b>Y04620</b>	pDSpHXK2	Multicopia con el gen SpHXK2

## **EXTRACCIÓN DE RNA**

Para llevar a cabo la extracción de RNA, se utilizó el kit RNeasy® Mini (Qiagen) el cual es usado para purificar el RNA total de levaduras. El RNA purificado mediante este kit puede ser utilizado para diferentes aplicaciones como microarreglos, RT-PCR y tiempo real RT-PCR, síntesis de cDNA, etc. El procedimiento de este kit combina las propiedades de unión selectiva de una membrana de sílica con la velocidad de una microcentrífuga. Las muestras se deben lisar primero mediante ruptura mecánica de la pared celular utilizando perlas de vidrio en presencia de buffer RLT que contiene guanidina y tiocianato, el cual inmediatamente inactiva RNAsas para asegurar la purificación del RNA. Posteriormente, se añade etanol para proveer las condiciones adecuadas de unión selectiva a la membrana. La muestra se añade a la columna de purificación donde el RNA total se une a la membrana y los contaminantes son eficientemente retirados. Finalmente se eluye el RNA con agua libre de RNAsas. Las muestras de RNA se guardaron a una temperatura de -70°C hasta su uso.

## **SÍNTESIS DE cDNA A PARTIR DE RNA**

Para convertir RNA a cDNA se utilizó el kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega). Primero se hizo una mezcla de RNA y oligo (dT)<sub>15</sub>, se calentó a 70°C durante 5 minutos enfriando inmediatamente en hielo durante 5 minutos para evitar la formación de estructuras secundarias del RNA. Por otro lado, se preparó una mezcla de transcriptasa reversa, agua libre de nucleasas, buffer de reacción, cloruro de magnesio, dNTPs e inhibidor de ribonucleasas de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La formación del cDNA se llevó a cabo con el siguiente programa de temperaturas en el termociclador: alineamiento a 25°C durante 5 minutos, reacción de síntesis de la primera hebra a 42°C durante 60 minutos y finalmente inactivación de la transcriptasa reversa a 70°C durante 15 minutos. Las muestras se almacenaron a una temperatura de -20°C.

## **COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE TRANSCRIPCIÓN DEL GEN SpHXK2**

La comparación de los niveles de transcritos del gen SpHXK2 se llevó a cabo mediante PCR semicuantitativo. Como los rendimientos de la transcripción reversa son variables, cada producto debe ser normalizado con un gen de referencia.

Primero se hizo un control con el gen de actina puesto que es un gen constitutivo. Utilizando nuestro cDNA en una mezcla de PCR y amplificando el gen de actina (*Act1*) de *Saccharomyces cerevisiae* con los primers ActScFo (5'- GTT TTG CCG GTG ACGAC-3') y ActScRe (3'- CTT TCG GCA ATA CCT GGG-5'), se logró igualar la cantidad de cDNA para hacer comparables los niveles de transcritos.

También se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gen de actina de *Schizosaccharomyces pombe*: ActSpFo (5'-TGA AAA CGC CGG TAT TCA TGA GGC-3') y ActSpRe (3'-GGA GCT AGG AGC AAG GGC TTG-5').

Finalmente se hizo otra reacción de PCR utilizando ahora los primers TSphxk2Fo (5'-TAT CTC GGT GAG CTT TTC CGCCG-3') y TSphxk2Re (3'-TTA CGA ACA TTC TCA GCA GAA CGTTC-5') que amplifican una región interna del ORF de 158pb del gen de hexocinasa dos de *Schizosaccharomyces pombe* usando las cantidades de cDNA que se igualaron el amplificado del gen de actina.

## **CULTIVOS**

### **PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO**

Se llevaron a cabo fermentaciones alcohólicas en 100mL de medio mínimo (MMHML) que contiene sales, vitaminas, trazas (ver apéndice) y glucosa como fuente de carbono (2%) adicionado con los aminoácidos histidina (0.02g/L), metionina (0.02g/L), leucina (0.1g/L), en una atmósfera microaeróbica. Dicha atmósfera se logró implementando un sistema en envases de material de vidrio (viales) con tapón de goma de caucho y tapa de aluminio, sellados con pinzas.

El procedimiento que se siguió para preparar los medios fue el siguiente: Se prepararon 100mL de medio mínimo en cada vial y se taparon con papel de aluminio, de ésta forma se colocaron en el autoclave para ser esterilizados. Por otro lado se colocaron los tapones de goma de caucho y las tapas de aluminio de cada vial en un recipiente cubierto con papel de aluminio y se esterilizaron por separado. La esterilización en autoclave se llevó a cabo durante 15 minutos a

121°C. Concluido este tiempo se dejaron enfriar los viales a temperatura ambiente.

Se agregó a cada medio los aminoácidos requeridos (0.02g/L His, 0.02g/L Met, 0.1g/L Leu) y benzoato de sodio según fuera el caso. Con guantes estériles se colocaron los tapones de goma de caucho y las tapas de aluminio y se sellaron con ayuda de las pinzas. Todo esto se llevó a cabo en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar la cual fue encendida e irradiada con radiación ultravioleta durante 15 minutos previo al montaje de los sistemas. El volumen de aire que quedó en el frasco es muy pequeño por lo que las condiciones de crecimiento se consideraron microaerófilas.

Se dejaron incubar los viales en una incubadora a 30°C durante toda la noche y al día siguiente se sacaron para inocular cada uno.

También se llevaron a cabo fermentaciones alcohólicas en una atmósfera aeróbica. Para lograrlo, se prepararon 100mL de medio mínimo (MMHML) en matraces de 250mL, se sellaron con tapones de algodón y se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos. De igual forma, se dejaron enfriar a temperatura ambiente sobre la mesa de trabajo en condiciones asépticas y se añadió a cada matraz 0.02g/L de histidina, 0.02g/L de metionina, 0.1g/L de leucina y benzoato de sodio (según fuera el caso). Se dejaron reposar los medios en una incubadora a 30°C durante toda la noche una noche previa la inoculación.



## **CONDICIONES DE CRECIMIENTO**

Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 30°C durante un período de 48 horas que duró cada fermentación. Los cultivos con una atmósfera microaeróbica se mantuvieron estáticos en una incubadora, mientras que los de atmósfera aerobia estuvieron en una incubadora con agitación (250rpm).

## **PRE-CULTIVO**

Se prepararon 50mL de medio mínimo (MMHML) por cada pre-cultivo en un matraz de 250mL el cual se inoculó a partir de una asada de la cepa transformada y resembrada en medio mínimo (MMHML) sólido, esto con el objetivo de asegurarse que la cepa se encontrara fresca. Se mantuvieron en agitación (250rpm) en una incubadora a 30°C durante 12 horas.

Concluido el tiempo de los pre-cultivos iniciadores, se tomó muestra de cada uno y se hizo una dilución 1:10 de la misma para tomar su lectura de densidad óptica a 600nm. El dato de absorbancia que arrojó la muestra se multiplicó por la dilución, posteriormente se dividió entre la densidad óptica a la cual se quería llegar, de esta forma conocíamos las veces que debíamos diluir la muestra y finalmente se dividió el volumen del frasco de cultivo a inocular entre las veces a diluir lo cual nos daba por resultado los mL del pre-cultivo que llevarían a los 100mL de medio nuevo a la densidad óptica deseada. Se tomó el volumen respectivo y se centrifugó 3000rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el medio sobrante y las células se lavaron con agua destilada estéril. Nuevamente se centrifugaron 3000rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 1mL de medio

nuevo estéril. De esta manera, se prosiguió a inocular cada sistema. Se hizo uso de una jeringa de 10mL para inocular a los viales que se encontraban en una atmósfera microaeróbica.

## **PARÁMETROS A EVALUAR DURANTE LA FERMENTACIÓN**

Los parámetros que se evaluaron durante las fermentaciones fueron crecimiento, mediante densidad óptica a 600 nanómetros y cuantificación de etanol por cromatografía de gases.

La cepa BY4741 transformada con el vector multicopia pRS426 vacío fue utilizada como cepa control en todos los cultivos.

La cepa BY4741 transformada con el vector pDspHXK2 y la cepa Y04620 (hvk2 $\Delta$ ) transformada con el vector pRS426 fueron evaluadas como cepas a evaluar.

## **EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DURANTE LA FERMENTACIÓN MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD ÓPTICA. CURVAS DE CRECIMIENTO**

La densidad óptica se determinó a una longitud de onda de 600nm en un espectrofotómetro. La lectura se realizó directamente de la muestra y si era necesario se hacía una dilución para que la absorbancia medida estuviera en un intervalo entre 0.1-0.6. Como blanco se utilizó una muestra de agua.

Para construir las curvas de crecimiento se tomaron muestras de 1mL cada dos horas durante las primeras 8 horas de la fermentación, a las 24 horas y a las 48 horas. Se tomó como tiempo inicial el tiempo al cuál se inoculó cada cultivo. Se

leyó la absorbancia de cada muestra y se construyó una gráfica de densidad óptica contra tiempo de fermentación.

Para calcular la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) se eligió de cada curva de crecimiento la fase exponencial y se prosiguió a hacer un análisis linear. Se obtuvo la pendiente ( $m$ ) a partir de una gráfica de  $DO_{600}$  vs tiempo. Se utilizaron las siguientes fórmulas para calcular el tiempo dichos parámetros:

$$t_d = \frac{\log 2}{m}$$

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d}$$

## **CUANTIFICACIÓN DE ETANOL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES**

Se utilizó un cromatógrafo de gases GC-2010 SHIMADZU. Se utilizó una columna HP-PLOT/U de una longitud de 30m, 10 $\mu$ m de espesor de la membrana y un diámetro interno de 0.32mm. El software utilizado fue GC Solution. El tiempo de análisis fue de 15 minutos, a una temperatura del inyector de 180°C y el modo de inyección fue Split, con un ratio de Split de 100. El gas acarreador fue Helio y el modo del control de flujo fue mediante presión. La presión fue de 75KPa, el flujo total de 89.9mL/min, el flujo de la columna 0.86mL/min, la velocidad linear 26.2cm/s y el flujo de purga 3mL8min. Temperatura del detector FID de 200°C.

Se seleccionaron muestras al tiempo inicial ( $t_0$ ), a las 8 horas ( $t_8$ ), a las 24h ( $t_{24}$ ) y a las 48h ( $t_{48}$ ) durante la fermentación. Se tomó una alícuota de 1mL en un tubo eppendorf de 1.5mL y se centrifugaron a 13000rpm durante 2 minutos, se recuperó el sobrenadante. Se diluyeron las muestras 1:10 y se filtraron con una

malla Millipore 0.45 $\mu$ m. De esta forma, se inyectaron 5 $\mu$ L de las muestras directamente al cromatógrafo de gases.

Se construyó una curva de calibración para la cuantificación de etanol en las muestras, utilizando etanol al 95% (SIGMA). La curva patrón cubrió los porcentajes de etanol 0.01%, 0.095%, 0.02%, 0.03%, 0.05% y 0.19%. Posteriormente, se convirtieron a nmoles de etanol y se construyó la gráfica de área sobre la curva contra nmoles de etanol. Se extrapolaron los datos experimentales y se obtuvieron los nmoles de etanol respectivos de cada muestra.

## **PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES Y ENSAYOS ENZIMÁTICOS**

### **ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HEXOCINASA**

Las células de levaduras se recolectaron a una  $DO_{600nm}$  de 0.6 después de haberse duplicado. Se centrifugaron a 3000rpm durante 5 minutos, se eliminó el medio sobrante y se lavaron con 20mL de agua fría. Las células lavadas se traspasaron a un tubo eppendorf de 1.5mL, se centrifugaron y se eliminó el agua restante. Se agregaron 100 $\mu$ L de Buffer MOPS 50mM pH 7, DTT 1mM, EDTA 1mM y PMSF 1mM. Posteriormente, se agregaron aproximadamente 600 $\mu$ L de perlas de vidrio a cada tubo y se llevaron a cabo 6 ciclos de 1 minuto vórtex y 1 minuto de reposo en hielo. Se centrifugaron a 14000rpm durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el extracto celular.

La actividad enzimática de la hexocinasa dos se hizo mediante un ensayo acoplado con glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

La enzima hexocinasa (HK) cataliza la fosforilación de Glucosa por adenosín-5'-trifosfato (ATP) con la formación simultánea de adenosín-5-disfosfato (ADP) y glucosa-6-fosfato (G6P). En presencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), la forma de glucosa -6-fosfato (G6P) es específicamente oxidada por nicotinamida-adenín dinucleótido fosfato (NADP) a gluconato-6-fosfato con la formación de nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) reducido. El NADPH que se forma por esta reacción de óxido reducción se mide en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340nm, en celdas de plástico de 1mL.

La actividad se midió con MgCl<sub>2</sub> (36mM), ATP (4mM), NADP (0.5mM) y Buffer MOPS (50mM) pH 7 previamente atemperado a 30°C. Se dejó correr una línea basal y posteriormente se agregó el extracto enzimático diluido 1:1000 en buffer MOPS (50mM pH 7) adicionado con DTT (1mM), PMSF (1mM) y EDTA (1mM), nuevamente se dejó correr una basal para asegurarse que la reacción aún no se estuviera llevando a cabo. Finalmente se agregó el sustrato glucosa (1.6mM) y fue entonces cuando se obtuvo una pendiente de cambio de absorbancia en el tiempo proporcional a la actividad. La unidad de actividad enzimática está definida como la cantidad de enzima que se requiere para transformar en producto una μmol de sustrato por minuto. Para calcular la actividad se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\frac{\text{Lowry (mg/mL)}}{\text{dil extracto}} * \frac{\text{alícuota}}{1000} = \text{mg P celda}$$

$$\frac{m}{\epsilon (6.22)} * \frac{60}{\text{mg P celda}} = \text{Actividad } (\mu\text{mol} * \text{min}^{-1} \text{ mgP}^{-1})$$

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar ( $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

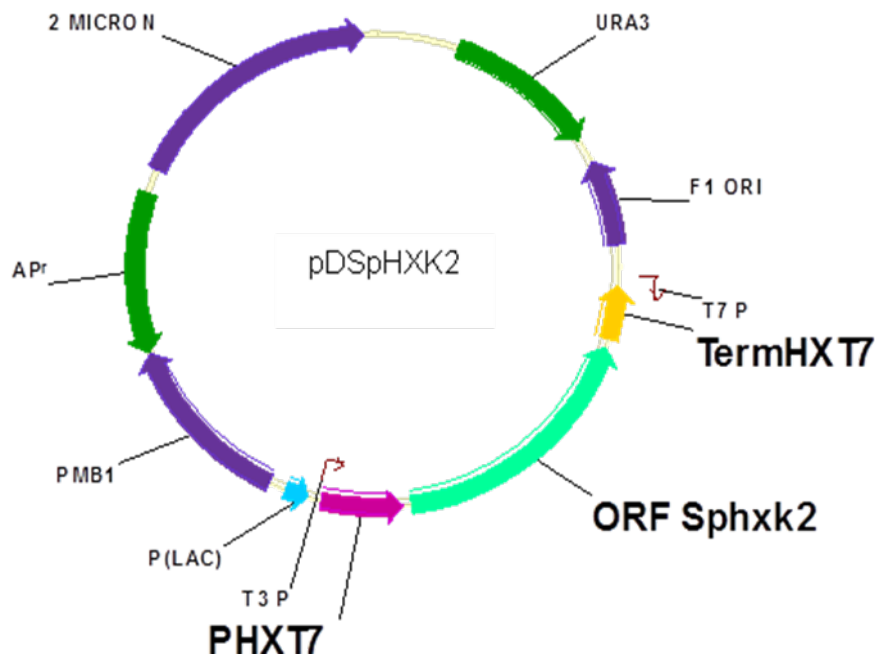
## CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Lowry (Lowry OH *et al*, 1951). Se hizo una dilución 1:10 de cada muestra a cuantificar y se repartió en alícuotas de 10 $\mu\text{L}$ , 15 $\mu\text{L}$  y 20 $\mu\text{L}$  en tubos de ensaye y se llevaron a 100 $\mu\text{L}$  con agua. Paralelamente se realizó una curva patrón de concentraciones de 0, 20, 40, 60 y 80  $\mu\text{g}$  de albúmina de suero de bovino (BSA) aforadas a 100 $\mu\text{L}$  con agua. Posteriormente a todas las muestras se les agregó 1mL de la mezcla solución A: solución B en una proporción de 50:1 (ver apéndice), se agitaron y se incubaron durante diez minutos a temperatura ambiente. Concluido el tiempo, se les añadió 100 $\mu\text{L}$  de Folin diluido 1:2 y nuevamente se agitó a cada muestra. Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y finalmente se leyó la absorbancia de cada una a 660nm en un espectrofotómetro. Se construyó una curva patrón de absorbancia contra concentración de BSA y se ajustó a una línea recta con regresión lineal obteniendo de esta forma la ecuación de la recta para extrapolar las absorbancias que arrojó cada muestra y así conocer la concentración de proteína.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### CLONACIÓN DEL GEN SpHXK2 EN EL PLÁSMIDO pRS426

Con ayuda del software vector NTI se realizó el esquema del plásmido pDSpHXK2 en donde se observa la clonación completa del gen SpHXK2 de *Schizosaccharomyces pombe* en el plásmido de sobre-expresión para levaduras pRS426. En la figura 9 se observa al ORF del gen SpHXK2, bajo el promotor constitutivo HXT7t y bajo el terminador HXT7. Se observa también el sitio de replicación 2 Micrones, el cassette de selección por prototrofia a uracilo URA3 y el sitio de resistencia a ampicilina en el caso de bacterias.



**Figura 10.** Plásmido pDSpHXK2. ORF del gen SpHXK2 (ORF Sphxk2), bajo el control del promotor HXT7t (PHXT7) y el terminador HXT7 (TermHXT7). Es un plásmido multicopia de levadura ya que contiene el origen de replicación 2 MICRONES.

Posteriormente se transformó la cepa silvestre BY4741 con este plásmido pDSpHXK2 (BY4741/pDSpHXK2) y las transformantes se seleccionaron por su prototrofia a uracilo obteniendo de esta forma clones positivas.

Se mandó a secuenciar el plásmido pDSpHXK2 al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y el resultado de la comparación entre la secuencia experimental y la secuencia real de cada gen fue el que se muestra en la Figura 11.

TAGGAACAATTTGGGCCCTGCGTGTTCTTCTGAGGTTCACTTTTACATTTGCTTCTGCTGG  
ATAATTTTCAGAGGCAACAAGGAAAAATTAGATGGCAAAAAGTCGTCTTTCAAGGAAAAATCC  
CCACCATCTTTGAGACTCCCTGTAACCTATTGGCAACTGAAAGAATGAAAAGGAGGAAAAATA  
CAAAATATACTAGAACTGAAAAAAAAGTATAAATAGAGACGATATATGCCAATACTTCAC  
AATGTTGCAATCTATTCTTCAATTGCGAGTATTGTAAAATAATAAACATCAAGAACAACAAG  
CTCAACTTGTCTTTCTAAGAACAAGAATAAACACAAAAACAAAAAGTTTTTTAATTTAAT  
CAAAAAGCTAGCGCGCGCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCC  
CGGGCTGCAGGAATTCATGGAGGCTAATTTCAACAAGCTGTTAAAAAGTTAGTCAATGACTT  
TGAATACCTACCGAGTCCTTGAGAGAGGCCGTTAAGGAGTTGACGAATTACGTCAAAGG  
GTTTACAAAAGAATGGTGAGGTGCTTGCTATGGCTCCTGCCCTTATCTCTACCCTTCCACCG  
GCGCTGAAACTGGTGACTTCTGGCCCTTGACTTTGGTGGTACCAACTGCGTGTGTTGTTGGA  
TCCAATTCTCGGTGACGGCAAGTATGAGATGAAGCACAGCAAGTCCGTCTTGCCCCGTGAA  
TGCGTTCGTAACGAGTCTGTTAAGCCCATCTTGACTTTATGAGTGACCATGTTGAGCTTTTCA  
TCAAGGAGCACTTCCCTTCCAAGTTTGGCTGCCCTGAGGAGGAATACCTTCTATGGGTTTCA  
CCTTTTCTTATCCCGCCAACCAAGTTTCCATCACCGAGAGCTACTTGCTTCGTTGGACCAAGG  
GTCTTAACATTCCTGAGGCCATCAACAAGGACTTTGCCAATTTTTGACTGAAGGTTTCAAGG  
CTCGTAACCTTCTATTAGAATCGAGGCTGTCATCAACGATACCGTCGGTACTCTCGTTACCC  
GTGCTTATACTTCAAAGGAGAGCGACACCTTTATGGGTATCATTTTCGGAACCGGTACCAACG  
GTGCTTACGTCGAGCAAATGAACCAAATCCCAAGCTTGCTGGCAAGTGTACTGGTGATCATA  
TGCTTATCAACATGGAATGGGGAGCAACTGATTTCTCTTGCCTTCACTCCACTCGTTATGATTT  
ACTTCTTGATCATGATACTCCAATGCTGGTCGTCAAATCTTTGAGAAGCGCGTGGTGGTAT  
GTATCTCGGTGAGCTTTTCCGCCGTGCCCTTATCCACTTGATCAAGGTTTACAACCTTCAACGAA  
GGTATTTTCCCTCCTTCCACTGATGCTTGGTCTTTGGAACTTCTGTTCTTTCCAGAATGAT  
GGTTGAACGTTCTGCTGAGAATGTTGTAACGTTCTTAGTACATTCAAGTTCCGTTTCCGCAGC  
GACGAAGAGGCTTTGTACCTTTGGGATGCTGCTCATGCAATTGGCCGTCGTGCTGCTCGTATG  
TCTGCCGTTCCATTGCTTCTTGTATCTTCTACCGGCCGCGCTGGTAAGAAGAGTGATGTTG  
GTGTTGATGGTCTTTAGTCGAACACTATCCTCACTTTGTTGACATGCTCCGTGAAGCCTTGGC  
TGAGCTTATCGGTGATAACGAAAAATTGATTTCCATTGGTATTGCCAAGGATGGCAGTGGTAT  
TGGTGCCGCTCTTTGCCCTCCAAGCTGTTAAGGAAAAGAAAGGCTTGGCCTAAGGAATTCCG  
CGCGC

ATCGAATTTGCGAACACTTTTATTAATTCATGATCACGCTCTAATTTGTGCATTTGAAA  
TGTAATCTAATTTAATTTTATATTTTAAATGATATCTTGAAAAGTAAATACGTTTTTAATATATA  
CAAAATAATACAGTTTAAATTTCAAGTTTTTGGATCTTTGTTCTCAGAAAGTTGAGTGGGACGG  
AGACAAAGAACTTTAAAGAGAAATGCAAAGTGGGAAGAAGTCAGTTGTTTACCGACCGCAC  
TGTTATTCACAAATATTCCAATTTGCCTGCAGACCCACGTCCTCGAG

Figura 11. Secuencia real del plásmido pDSpHXK2



La secuencia resultante coincidió exactamente con la esperada. El ORF contiene 1368pb que corresponde al tamaño reportado para el gen que codifica para la enzima hexocinasa 2 (hvk2) de *Schizosaccharomyces pombe* (Thomas Petit, 1996). Dicha secuencia presenta un 51.3% de identidad respecto a la proteína hvk2 de *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, existe una secuencia de 72pb y 12pb, ubicada entre el promotor PHXT7 (fucsia) y el ORF Sphvk2 (verde) y entre el ORF Sphvk2 (verde) y el terminador TermHXT7 (subrayado en anaranjado), respectivamente, que corresponden a sitios de corte de enzimas de restricción que fueron arrastradas durante la clonación. Por lo que, se verificó que no hubiera codón de inicio en esta secuencia el cual pudiera alterar el marco de lectura del gen. También se identificó en rojo la secuencia altamente conservada (TTTATT) para el sitio de poliadenilación del RNA. Es por esto que se esperaba entonces que el gen se estuviera transcribiendo de manera normal.

### **ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA HEXOCINASA SOBRE-EXPRESADA**

Para verificar cinéticamente que la enzima hexocinasa de *Schizosaccharomyces pombe* (Sphvk2) en efecto se encontraba sobre-expresada (pDSpHXK2), se determinó espectrofotométricamente la actividad enzimática y se comparó con la actividad de la hexocinasa 2 de una cepa control de *Saccharomyces cerevisiae* transformada con el plásmido pRS426 que no contenía al gen SpHXK2 clonado (BY4741/pRS426).

Se realizó otro control para corroborar que la enzima estaba activa utilizando una cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* la cual tiene interrumpido al gen que

codifica para la hexocinasa dos (*hvk2Δ*) transformado con el plásmido pDSpHXK2 (*hvk2Δ/pDSpHXK2*) y con el plásmido pRS426 (*hvk2Δ/pRS426*). De esta manera se hizo una comparación entre las actividades de dichas cepas.

En las dos comparaciones que se realizaron, los resultados que arrojaron dichos ensayos, mostraron que no había diferencia entre éstas cepas (Tabla 2). Esto se atribuye a que la actividad enzimática de la hexocinasa heteróloga se regula a nivel posttranscrpcional. Sin embargo, esto no quiere decir que no se encuentre sobre-expresada a nivel de mRNA. Para corroborarlo fue importante llevar a cabo un análisis de los transcritos del gen SpHXK2.

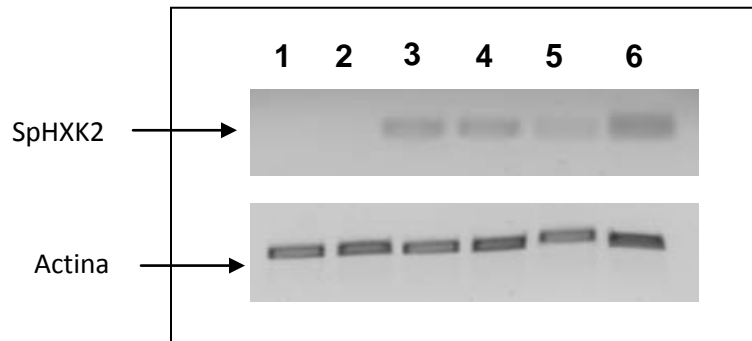
Actividad ( $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ )	
<b>BY4741/pRS426</b>	2.7 $\pm$ 0.6
<b>BY4741/pDSpHXK2</b>	2.6 $\pm$ 0.6
<b><i>hvk2Δ/pDSpHXK2</i></b>	1.1 $\pm$ 0.1
<b><i>hvk2Δ/pRS426</i></b>	1.1 $\pm$ 0.2

**Tabla 5.** Comparación de actividades enzimáticas Schxk2 vs Sphxk2 ( $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ).

## **COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE TRANSCRIPCIÓN DEL GEN *SpHXK2***

Se midieron los transcritos de la síntesis de cDNA a partir de RNA de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* transformada con el plásmido pRS426 (BY4741/pRS426) y se comparó con los transcritos de la cepa silvestre BY4741 transformada con el plásmido pDSpHXK2 (BY4741/pDSpHXK2) y con la cepa silvestre de *Schizosaccharomyces pombe* (WT *S. pombe*). En la figura 12 se muestra la

amplificación del cDNA que corresponde a una región de 158pb interna del gen, que codifica para la hexocinasa 2 de *Schizosacharomyces pombe*. Cada uno se realizó por duplicado.



**Figura 12.** PCR semicuantitativo de la comparación de los niveles de transcripción del gen *SpHxk2*. Carril 1 y 2 BY4741/pRS426. Carril 3 y 4 BY4741/pD*SpHxk2*. Carril 5 y 6 WT *S. pombe*

Como era de esperarse, no se encontró ningún amplificado para la cepa BY4741/pRS426 puesto que no contiene al gen *SpHxk2*. Resultando lo contrario para las siguientes cepas en donde sí se observó la banda representativa. Sin embargo, la cantidad de cDNA para amplificar el transcrito de la cepa silvestre de *S. pombe* fue mucho mayor a la utilizada por la cepa con el plásmido pD*SpHxk2* (Tabla 3). Esto nos podría estar hablando de la sobre-expresión del gen y de una regulación post-transcripcional que evita que la enzima heteróloga sea activa como se había mencionado previamente. Posteriormente, será necesario realizar experimentos utilizando la técnica de Western Blot para acompañar estos resultados, de esta manera podríamos conocer la presencia de la proteína sobre-expresada y de la no sobre-expresada de la cepa silvestre además de comparar la cantidad entre ellas.

Carril	Cepa	Cantidad de cDNA ( $\mu$ L)
1	BY4741/pRS426	1
2	BY4741/pRS426	1.6
3	BY4741/pD $\Delta$ SpHXK2	1.7
4	BY4741/pD $\Delta$ SpHXK2	0.7
5	WT <i>S. pombe</i>	3
6	WT <i>S. pombe</i>	5

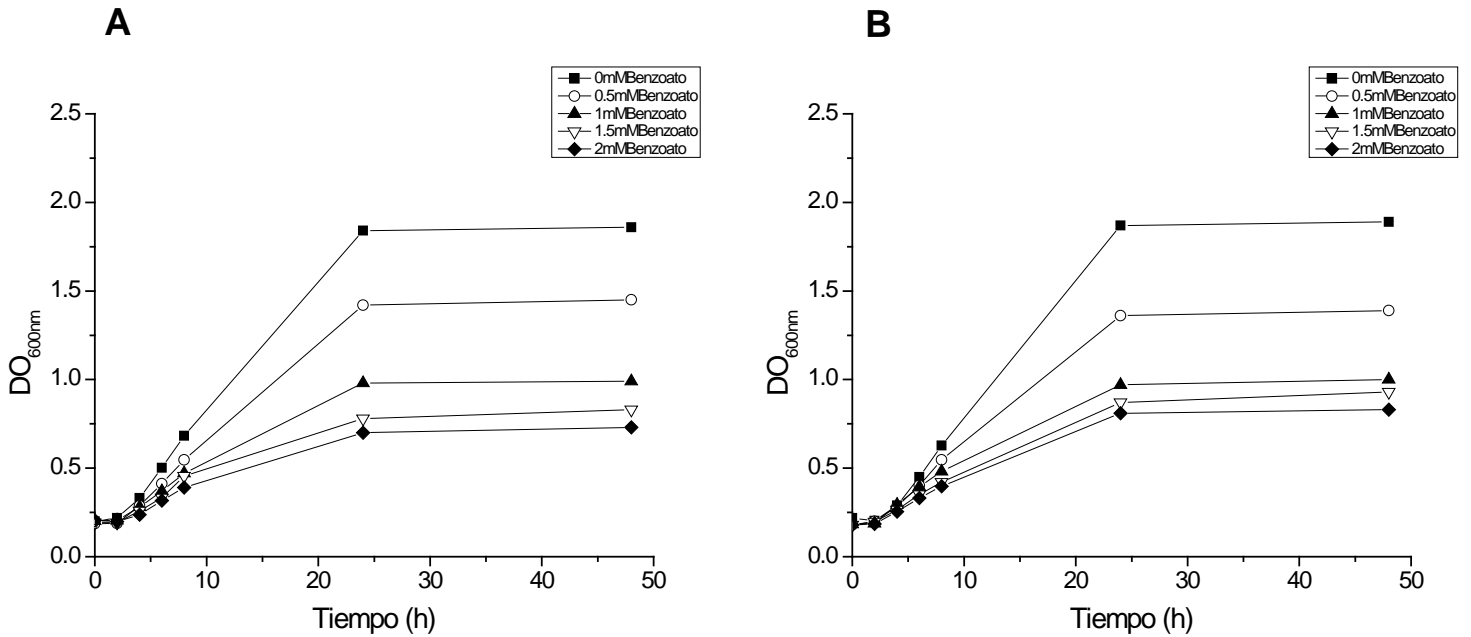
**Tabla 6.** Posible sobre-expresión del gen *SpHXK2* de acuerdo a la cantidad de cDNA usado como templado.

## EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO EN CONDICIONES MICROAERÓBICAS

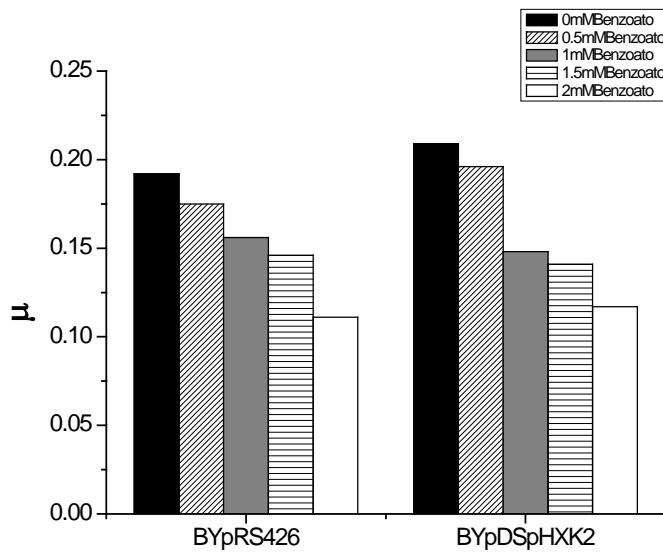
### (BY4741/pRS426 vs BY4741/pD $\Delta$ SpHXK2)

Se evaluó la capacidad de crecimiento de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* (BY4741/pRS426) y de la cepa silvestre que contiene al gen *SpHXK2* (BY4741/pD $\Delta$ SpHXK2) en un medio con 2% de glucosa como fuente de carbono a diferentes concentraciones de benzoato de sodio (0, 0.5, 1, 1.5 y 2mM) y en condiciones de atmósfera microaeróbica. Se encontró que no hubo diferencia entre éstas dos cepas. En la figura 13 se representan gráficamente los valores de densidad óptica obtenidos durante el tiempo. Se observa un aumento de la densidad óptica en los dos casos conforme incrementa el tiempo hasta las 24 horas manteniéndose prácticamente constante posterior a este tiempo hasta las 48 horas que duró la fermentación. También se puede ver que a mayores

concentraciones de benzoato de sodio el crecimiento se ve limitado en los dos experimentos.



**Figura 13.** Crecimiento en atmósfera microaeróbica a 30°C de la cepa silvestre **A)** BY4741/pRS426 y la cepa que sobre-expresa el gen SpHXK2 **B)** BY4741/pDSpHXK2.



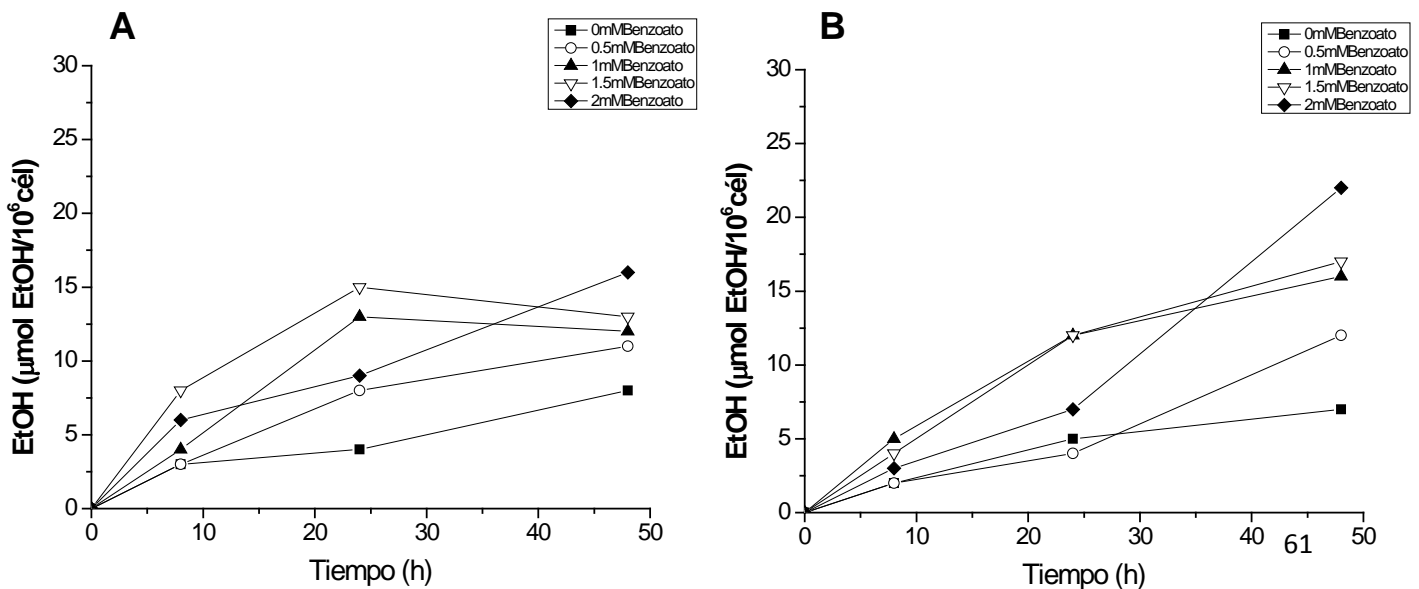
**Figura 14.** Velocidad específica de crecimiento entre la cepa silvestre (BY4741/pRS426) y la cepa que sobre-expresa el gen SpHXK2 (BY4741/pDSpHXK2).

Las muestras para calcular la velocidad específica de crecimiento se colectaron durante la fase exponencial de la curva de crecimiento de cada cepa. Se puede observar en la Figura 14 que, en las dos cepas, no se encontraron diferencias en cuanto a la velocidad de crecimiento.

### PRODUCCIÓN DE ETANOL (BY4741/pRS426 vs BY4741/pDSpHXK2)

Se determinó la producción de etanol en muestras que se colectaron a diferentes tiempos de la fermentación, que cubrieran las diferentes fases durante la curva de crecimiento.

Como se observa en la figura 15, la cepa que “sobre-expresa” al gen HXK2 de *Schizosaccharomyces pombe* presenta una tasa de producción de etanol muy similar a la cepa silvestre transformada con el plásmido pRS426 vacío. Era de esperarse este resultado puesto que en crecimiento y en actividades fueron prácticamente iguales. También se observa que la mayor producción de etanol en los dos casos fue en presencia de benzoato de sodio, sin embargo no resultó proporcional a la concentración de benzoato.



**Figura 15.** Producción de etanol en atmósfera microaeróbica 30°C de la cepa silvestre **A)** BY4741/pRS426 y la cepa que sobre-expresa el gen SpHXK2 **B)** BY4741/pDSpHXK2.

No se logró obtener el efecto sinérgico que se buscaba al utilizar de manera simultánea dos estrategias experimentales: la sobre-expresión de la enzima heteróloga y la demanda de ATP, debido a que la enzima Sphxk2 no estaba activa.

Puesto que se ha demostrado que incrementando el requerimiento de ATP en una cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae*, el flujo glicolítico se ve aumentado dos veces (Daran-Lapujade, 2007), se hizo un estudio de la demanda de ATP en una cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* la cual tiene interrumpido al gen que codifica para la hexocinasa dos ( $hvk2\Delta$ ) y se comparó con la cepa silvestre (By4741). El objetivo de utilizar a esta cepa mutante era demostrar que la actividad de hexocinasa estuviera limitando a la glicólisis. Por lo tanto la producción de alcohol en dicha cepa se vería disminuida.

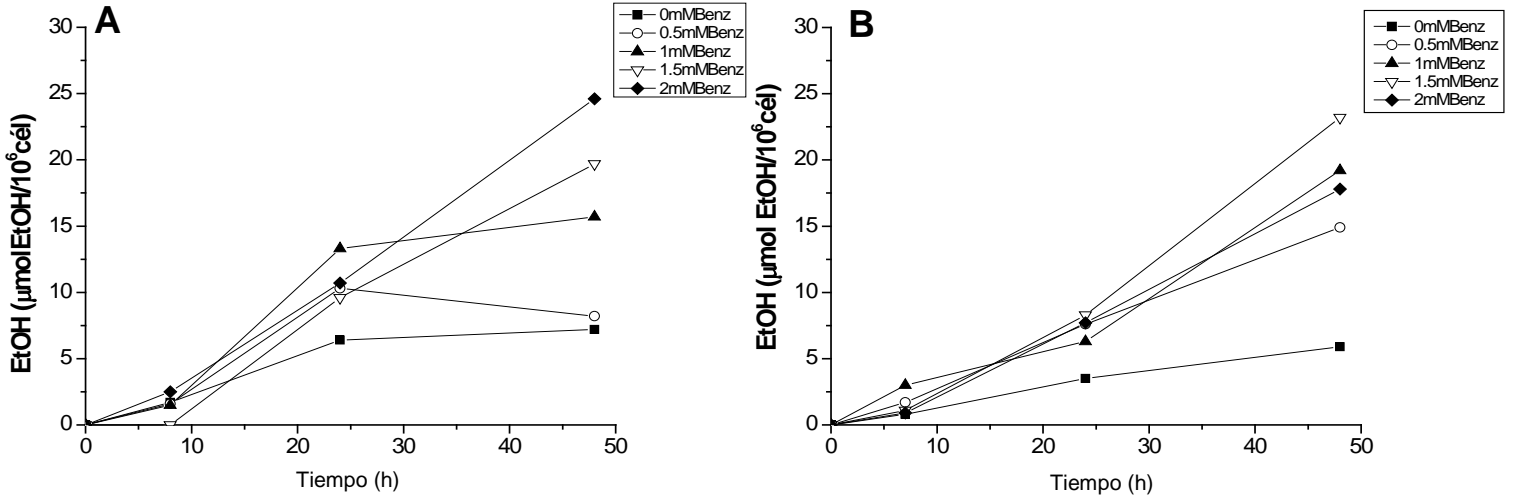
La demanda de ATP se estudió en un medio a diferentes concentraciones de benzoato de sodio, en un rango de 0 a 2mM, se cuantificó la producción de etanol espectrofotométricamente y el crecimiento se siguió en ambientes de atmósfera microaeróbica y anaeróbica como se describió anteriormente en materiales y métodos.

## **ATMÓSFERA MICROAERÓBICA (BY4741/pRS426 vs $hvk2\Delta$ /pRS426)**

### **PRODUCCIÓN ESPECÍFICA DE ETANOL**

Se puede observar que el benzoato en efecto aumentó la producción específica de etanol en la cepa silvestre y en la mutante (Figura 16), obteniendo una producción máxima de 25 $\mu$ mol de etanol por diez millones de células a una

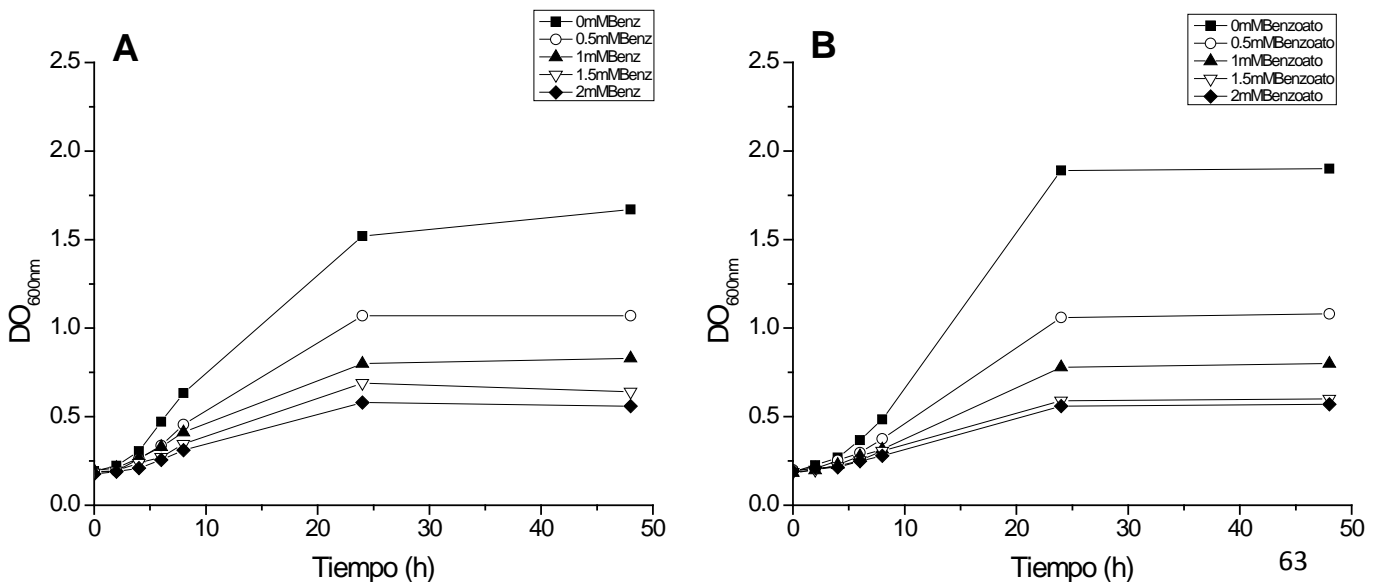
concentración de 2mM de benzoato de sodio. Se observa que la falta de la hexocinasa 2 reduce la producción de etanol a las 24 horas pero a las 48 horas, los niveles de producción de etanol son similares.



**Figura 16.** Producción de etanol en medio microaeróbico de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* **A)** BY4741/pRS426 y la cepa mutante de *S. cerevisiae* que tiene interrumpido al gen que codifica para la *hxx2* **B)** *hxx2Δ*/pRS426.

### CRECIMIENTO MICROAERÓBICO

En cuanto al crecimiento las dos cepas se comportaron prácticamente iguales, a menores concentraciones de benzoato hubo mayor crecimiento y a pesar de que a 24 y 48 horas la cantidad de células fue prácticamente constante, sí hubo producción de etanol específica.

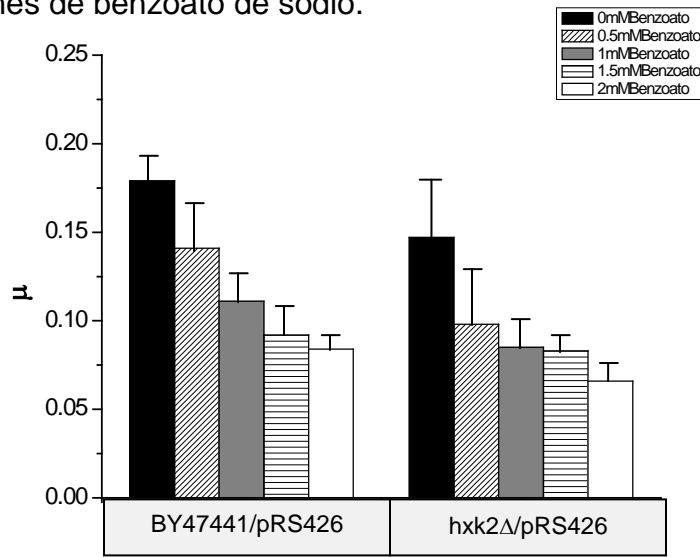


**Figura 17.** Crecimiento en medio microaeróbico de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* **A)** BY4741/pRS426 y la cepa mutante de *S. cerevisiae* que tiene interrumpido al gen que codifica para la *hxx2* **B)** *hxx2Δ*/pRS426.



## VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO

No se observan cambios drásticos en cuanto a la velocidad de crecimiento si comparamos las dos cepas. Lo que sí se observa de igual forma que en el crecimiento es una disminución en la velocidad con respecto a las concentraciones de benzoato de sodio.



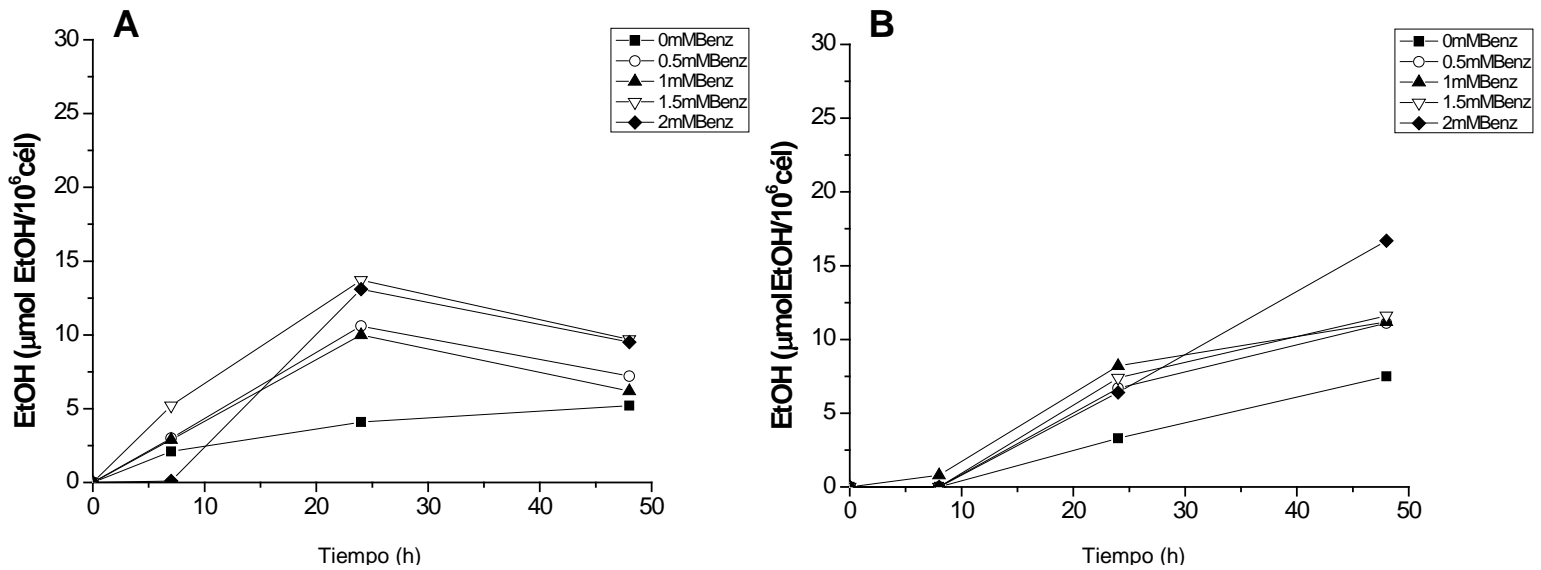
**Figura 18.** Velocidad específica de crecimiento de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* (BY4741/pRS426) y la cepa mutante de *S. cerevisiae* que tiene interrumpido al gen que codifica para la *hxx2* (*hxx2Δ*/pRS426).

## ATMÓSFERA AERÓBICA (BY4741/pRS426 vs *hxx2Δ*/pRS426)

### PRODUCCIÓN ESPECÍFICA DE ETANOL

Se puede observar en la figura 19, un aumento de la producción específica de etanol a las 24 horas en la cepa silvestre a mayores concentraciones de benzoato de sodio, disminuyendo a las 48 horas. Esto puede deberse a que al terminarse la glucosa las levaduras empezaron a consumir etanol como fuente de carbono. En el caso de la cepa mutante se observa aumento de etanol conforme la concentración de benzoato y a diferencia de la cepa silvestre, no se observa una

disminución en la producción de etanol a las 48 horas, lo cual puede ser debido a que la glucosa aún no es consumida en su totalidad.

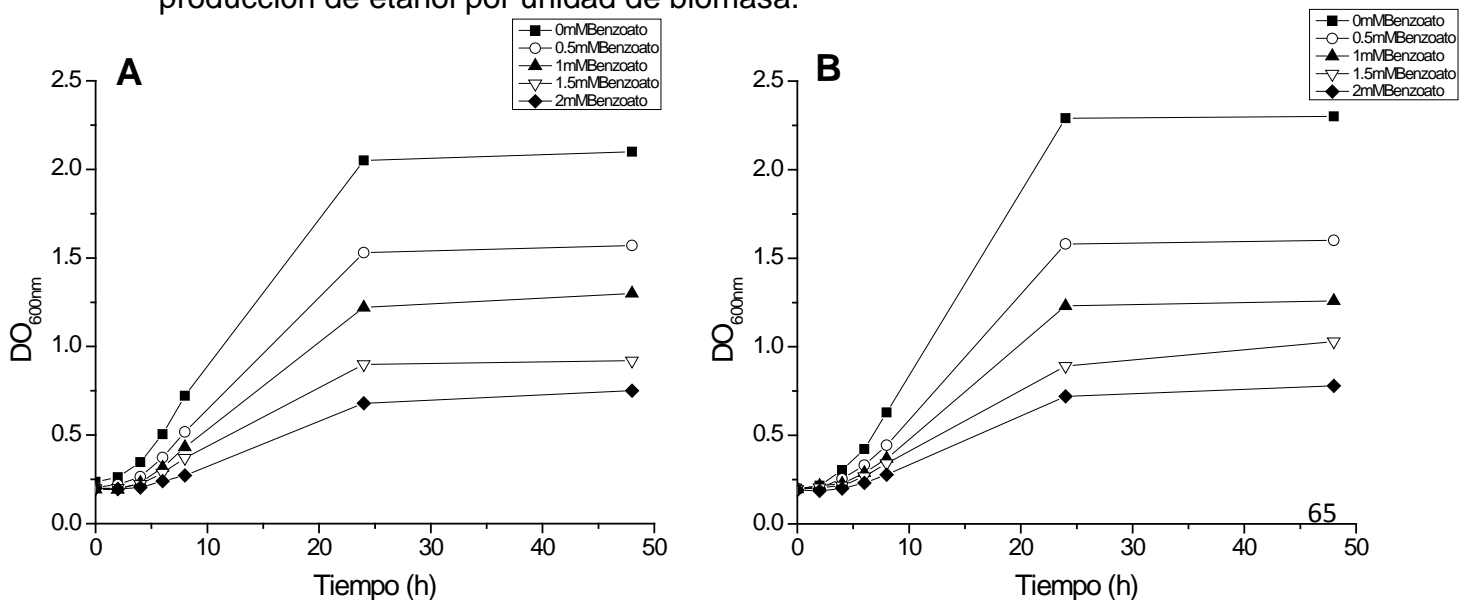


**Figura 19.** Producción de etanol en medio aeróbico de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* (BY4741/pRS426) y la cepa mutante de *S. cerevisiae* que tiene interrumpido al gen que codifica para la *hvk2* (*hvk2Δ*/pRS426).

### CRECIMIENTO AERÓBICO

De igual forma el benzoato disminuye el crecimiento de las levaduras en los dos experimentos y se comportan de manera similar (Figura 20).

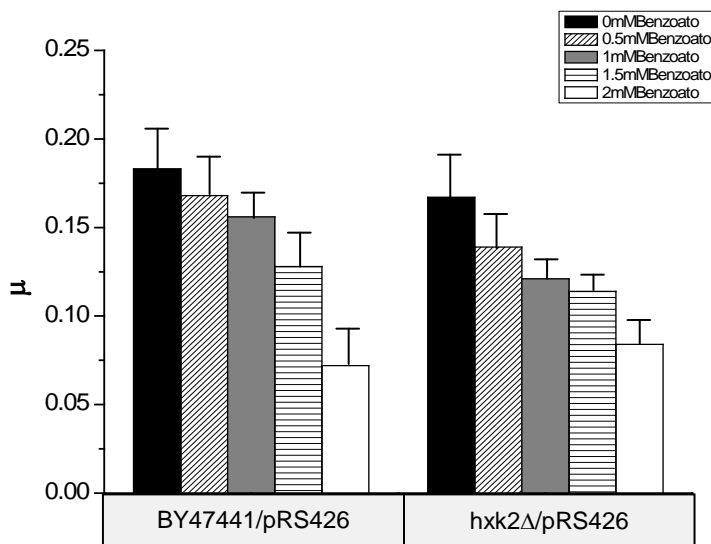
Ni en atmósfera microaeróbica ni en aeróbica la mutante se vio afectada en el crecimiento. Pero sí se observó diferencia entre ésta y la silvestre en cuanto a la producción de etanol por unidad de biomasa.



**Figura 20.** Crecimiento en medio aeróbico de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* **A)** BY4741/pRS426 y la cepa mutante de *S. cerevisiae* que tiene interrumpido al gen que codifica para la *hvk2* **B)** *hvk2Δ*/pRS426.

## VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO

No se observan diferencias en la velocidad específica de crecimiento entre las cepas silvestre y la mutante. Lo que sí se observa es la disminución que hemos obtenido en el crecimiento debido al benzoato de sodio.



**Figura 21.** Velocidad específica de crecimiento de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* (BY4741/pRS426) y la cepa mutante de *S. cerevisiae* que tiene interrumpido al gen que codifica para la *hxx2* (*hxx2Δ*/pRS426).

La disminución en la producción de etanol observada en la mutante *hxx2Δ* a las 24 horas indicó que la isoforma *Hxx1* no puede suplir la función de *Hxx2*, probablemente debido a que se expresa preferentemente a bajas concentraciones de glucosa.

La producción de etanol por cada célula sí aumenta con benzoato de sodio por lo tanto, una mayor demanda energética promueve la glicólisis. Sin embargo, la concentración final de etanol no aumentó por efecto del benzoato. Dicha concentración depende de la disponibilidad de glucosa y la tolerancia a etanol, parámetros que no eran variables a estudiar en el presente trabajo.

## PORCENTAJE DE ETANOL EN CONDICIONES MICROAERÓBICAS Y AERÓBICAS

En la tabla 7, se observa que el porcentaje de etanol en ambas condiciones no supera el 2%. Esto se puede deber a que probablemente se encuentra cerca del límite de tolerancia a etanol típica de cepas de laboratorio, las cuales son haploides y tienen auxotrofías.

Dado que las mayores concentraciones de etanol se alcanzaron en presencia de 2mM de benzoato, las comparaciones de las concentraciones finales y de las velocidades se realizaron con los datos correspondientes a esa concentración del desacoplante.

Hasta las 24 horas la producción de etanol de la cepa silvestre fue mayor en porcentaje que la mutante en condiciones microaeróbicas y aeróbicas. Sin embargo en condiciones aeróbicas, a las 48 horas el porcentaje en la cepa silvestre disminuyó en comparación con la mutante, lo cual pudo deberse a que al no haber otra fuente de carbono, la cepa silvestre empezó a consumir etanol.

**Tabla 7.** Porcentaje de etanol a 2mM de Benzoato

		Producción de etanol (%)	
		BY4741/pRS426	hxx2Δ/pRS426
Microaeróbico	Tiempo (h)		
	24	0.52	0.37
	48	1.17	0.86
Aeróbico	24	0.76	0.39
	48	0.61	1.11

## VELOCIDAD ESPECÍFICA DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

El cálculo de las velocidades de producción de etanol se debería realizar con un mayor número de muestras. Sin embargo, con nuestros datos podemos estimar las velocidades y comparar las diferentes cepas y condiciones.

Como era de esperarse, la velocidad específica de producción de etanol fue proporcional a la concentración de benzoato. Para los cultivos microaerófilos de la cepa de referencia y la que contiene al gen heterólogo las velocidades se calcularon con los datos de 0 a 8 hrs de la figura 15. Para la cepa de referencia y la mutante *hvk2Δ*, las velocidades se calcularon con los datos de 8 a 24 hrs de la figura 16; ya que en estas fases se obtuvo un comportamiento lineal. A 2mM de benzoato no se cumplió la tendencia de aumento de la velocidad, probablemente esta concentración resulta tóxica.

**Tabla 8.** Velocidad específica de producción de etanol en condiciones microaeróbicas de la cepa de referencia y la que contiene al gen heterólogo.

Microaeróbico									
Velocidad ( $\mu\text{mol}/10^6\text{cél}\cdot\text{h}$ )									
BY4741/pRS426					BY4741/pDSpHXK2				
Benzoato de sodio (mM)					Benzoato de sodio (mM)				
0	0.5	1	1.5	2	0	0.5	1	1.5	2
0.32	0.32	0.47	0.93	0.8	0.25	0.25	0.62	0.5	0.3

**Tabla 9.** Velocidad específica de producción de etanol en condiciones microaeróbicas de la cepa de referencia y la mutante.

Microaeróbico									
Velocidad ( $\mu\text{mol}/10^6\text{cél}\cdot\text{h}$ )									
BY4741/pRS426					hxx2Δ/pRS426				
Benzoato de sodio (mM)					Benzoato de sodio (mM)				
0	0.5	1	1.5	2	0	0.5	1	1.5	2
0.3	0.58	0.73	0.56	0.53	0.12	0.37	0.22	0.44	0.41

Para los cultivos aerófilicos de la cepa de referencia y la mutante hxx2Δ, las velocidades se calcularon con los datos de 8 a 24 hrs de la figura 19.

**Tabla 10.** Velocidad específica de producción de etanol en condiciones aeróbicas de la cepa de referencia y la mutante.

Aeróbico									
Velocidad ( $\mu\text{mol}/10^6\text{cél}\cdot\text{h}$ )									
BY4741/pRS426					hxx2Δ/pRS426				
Benzoato de sodio (mM)					Benzoato de sodio (mM)				
0	0.5	1	1.5	2	0	0.5	1	1.5	2
0.11	0.49	0.42	0.53	0.81	0.18	0.42	0.44	0.44	0.41

Como era de esperarse, la velocidad específica de producción de etanol en condiciones aeróbicas disminuyó debido a la presencia de oxígeno y a la disminución de glucosa externa, en comparación con medio microaeróbico.

En medio aeróbico una vez que la glucosa es consumida, el etanol es oxidado a  $\text{CO}_2$  y por eso se espera menor producción de etanol.

## CONCLUSIONES

- Se logró obtener la construcción de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* en donde se llevó a cabo la clonación completa del gen SpHXK2 de *Schizosaccharomyces pombe*, el cual es insensible a inhibición por trehalosa-6-fosfato, en el plásmido de sobre-expresión para levaduras pRS426 (pDSpHXK2), con un 51.3 % de identidad respecto a la proteína de hXK2 de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Cinéticamente no se logró demostrar la sobre-expresión de la enzima hXK2 de *Schizosaccharomyces pombe* en pDSpHXK2 que se esperaba. La producción de etanol, así como la velocidad de crecimiento en comparación con la cepa silvestre fue muy similar, debido a que la enzima heteróloga no se encontraba activa.
- Se realizó un análisis de los transcritos del gen SpHXK2 tanto de la cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* transformada con el plásmido pRS426 como de la cepa silvestre, transformada con el plásmido pDSpHXK2 y de la cepa silvestre de *S. pombe*, en donde se obtuvieron amplificadores para aquellas cepas que contenían al gen SpHXK2, demostrando así la posible sobre-expresión a nivel de mRNA.
- No se logró obtener el efecto sinérgico que se esperaba al utilizar de manera simultánea la sobre-expresión de la enzima SpHxk2 y la demanda de ATP.

- Se estudió la demanda de ATP mediante el uso de benzoato de sodio y en condiciones aeróbicas y microaérobicas, comparando una cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa silvestre. En general, la producción específica de etanol aumentó a mayores concentraciones de benzoato en ambas cepas, mientras que el crecimiento se vio disminuido.
- El porcentaje de la producción de etanol en medio aeróbico fue menor en comparación en medio microaeróbico.



## APÉNDICE

### MEDIO YES

(Medio para *Schizosaccharomyces pombe*)

---

	<b>100mL</b>
Extracto de levadura	0.5g
Glucosa	3g
Adenina (0.05g/25mL)	10mL
Histidina (0.25g/25mL)	2mL
Leucina (0.25g/25mL)	2mL
Uracilo (0.05g/25mL)	10mL
Agua	a 100mL
*Agar	2g

---

\*Si es medio sólido.

### MEDIO MÍNIMO

---

	<b>100mL</b>
Stock Vitaminas	100 $\mu$ L
Stock trazas	100 $\mu$ L
Stock Sales	2mL
Glucosa	2g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5g
*Agar	2.5g

---

\*Si es medio sólido

## **SOLUCIONES STOCK**

### **VITAMINAS 1000X**

---

Biotina	2mg
Pantotenato de calcio	400mg
Ácido fólico	2mg
Niacina	400mg
Ácido p-aminobenzoico	200mg
Piridoxina-HCl	400mg
Riboflavina	200mg
Tiamina-HCl	400mg
Inositol	200mg
Agua destilada	1000mL

---

Nota: Disolver perfectamente  
agregando 5 o 6 lentejas de NaOH.

CONGELAR

### **ELEMENTOS TRAZA 1000X**

---

Ácido bórico	500mg
Sulfato cúprico	40mg
Ioduro de potasio	100mg
Cloruro férrico	200mg
Sulfato manganoso	400mg
Molibdato de sodio	200mg
Sulfato de zinc	400mg

Agua destilada 1000mL

---

Nota: REFRIGERAR

### **SALES 50X**

---

Fosfato de potasio monobásico	50g
Sulfato de magnesio	5g
Cloruro de sodio	1g
Cloruro de calcio	1g
Agua destilada	1000mL

---

Nota: Una vez disueltas agregar 5mL de cloroformo. REFRIGERAR

### **MEDIO LB + Ampicilina**

---

	<b>100mL</b>
Triptona	1g
Extracto de levadura	0.5g
NaCl	1g
Ampicilina (100µg/mL)	100µL
*Agar	2g

---

\*Si es medio sólido

### **Buffer de Fosfatasa Alcalina**

---

Tris-HCl	0.5mM
MgCl <sub>2</sub>	50mM

pH 8.5

---

### TE/LiOAc

---

Acetato de litio 1M	1200 $\mu$ L
Tris HCl 1M pH 7.5	120 $\mu$ L
EDTA 0.5M pH 8	24 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	10.656mL

### PEG/TE/LiOAc

---

PEG 3350, 45%	2.25mL
Acetato de litio	250 $\mu$ L
Tris HCl 1M pH 7.5	25 $\mu$ L
EDTA 0.5M pH 8	5 $\mu$ L

### LOWRY

---

SOLUCIÓN A	SOLUCIÓN B
2% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4% CuSO <sub>4</sub>
0.4% NaOH	
0.16% Tartrato de Na-K	
1% SDS	

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Balat M, Balat H, Öz C.** Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2008; **34**(5):551–573.
2. **Blázquez MA, Lagunas R, Gancedo C, Gancedo JM.** Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett*. 1993; **329**(1.2):51-4.
3. **Blázquez MA, Stucka R, Feldmann H, Gancedo C.** Trehalose-6-P synthase is dispensable for growth on glucose but not for spore germination in *Schizosaccharomyces pombe*. *J of Bacteriol*. 1994; **176** (13):3895-3902.
4. **Bonini BM, Van Dijck P, Thevelein JM.** Uncoupling of the glucose growth defect and the deregulation of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae* Tps1 mutants expressing trehalose-6-phosphate-insensitive hexokinase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys Acta*. 2003; **1606**(1-3):83-93.
5. **Cabib E, Leloir LF.** The biosynthesis of trehalose phosphate. *J Biol Chem*. 1958; **231**(1):259-75.

6. **Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH, Hieter P.** Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*. 1992; **110**(1):119-22.
  
7. **Daran-Lapujade P, Rossell S, van Gulik WM, Luttik MA, de Groot MJ, Slijper M, Heck AJ, Daran JM, de Winde JH, Westerhoff HV, Pronk JT, Bakker BM.** The fluxes through glycolytic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* are predominantly regulated at posttranscriptional levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; **104**(40):15753-8.
  
8. **Demirbas, A.** Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*. 2008; **49** (8) 2106–2116.
  
9. **Diderich JA, Raamsdonk LM, Kruckeberg AL, Berden JA, Van Dam K.** Physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* from which hexokinase II has been deleted. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67(4):1587-93.
  
10. **Eastmond PJ, Graham IA.** Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate?. *Curr Opin Plant Biol*. 2003; **6**(3):231-5.

- 11.Flores CL, Rodriguez C, Petit T, Gancedo C.** Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol.* 2000 Rev 24:507–529
- 12.Francois J, Parrou JL.** Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews.* 2001; **25**(1):125-145
- 13.Gancedo JM.** Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; **62**(2):334-61.
- 14.Gustafsson L.** Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Rep.* 2004; **5**(5):532-7.
- 15.Hauf J, Zimmermann FK, Müller S.** Simultaneous genomic overexpression of seven glycolytic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology.* 2000; **26** (9-10): 688–698.
- 16.Hazan R, Levine A and Abeliovich H.** Benzoic Acid, a Weak Organic Acid Food Preservative, Exerts Specific Effects on Intracellular Membrane Trafficking Pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 2004, **70**(8): 4449-4457.

- 17. Henriques M, Quintas C and Loureiro-Dias MC.** Extrusion of benzoic acid in *Saccharomyces cerevisiae* by an energy-dependent mechanism. *Microbiology*. 1997, **143** 1877-1883.
- 18. Herrero P, Martínez-Campa C, Moreno F.** The hexokinase 2 protein participates in regulatory DNA-protein complexes necessary for glucose repression of the *SUC2* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 1998; **434**(1-2):71-6.
- 19. Hounsa CG, Brandt EV, Thevelein J, Hohmann S, Prior BA.** Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology*. 1998; **144**( Pt 3):671-80.
- 20. Jules M, Beltran G, Francois J, Parrou JL.** New Insights into Trehalose Metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: *NTH2* Encodes a Functional Cytosolic Trehalase, and Deletion of *TPS1* Reveals Ath1p-Dependent Trehalose Mobilization. *Appl Environ Microbiol*. 2008; **74**(3):605–614.
- 21. Koebmann BJ, Westerhoff HV, Snoep JL, Solem C, Pedersen MB, Nilsson D, Michelsen O, Jensen PR.** The extent to which ATP demand controls the glycolytic flux depends strongly on the organism and conditions for growth. *Mol Biol Rep*. 2002; **29**(1-2):41-5.



- 22.Koebmann BJ, Westerhoff HV, Snoep JL, Nilsson D, Jensen PR.** The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J Bacteriol.* 2002b; **184**(14):3909-16.
- 23.Kresnowati MT, van Winden WA, van Gulik WM, Heijnen JJ.** Energetic and metabolic transient response of *Saccharomyces cerevisiae* to benzoic acid. *FEBS J.* 2008; **275**(22):5527-41.
- 24.Larsson C, Pålman IL, Gustafsson L.** The importance of ATP as a regulator of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 2000; **16**(9):797-809.
- 25.Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; **193**(1):265-75.
- 26.Ma H, Botstein D.** Effects of null mutations in the hexokinase genes of *Saccharomyces cerevisiae* on catabolite repression. *Mol Cell Biol.* 1986; **6**(11):4046-52.
- 27.Ma H, Bloom LM, Zhu ZM, Walsh CT, Botstein D.** Isolation and characterization of mutations in the *HXK2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1989; **9**(12):5630-42.

- 28.Nelson, David L.** Principios de Bioquímica. Cuarta Edición.
- 29.Otterstedt K, Larsson C, Bill RM, Ståhlberg A, Boles E, Hohmann S, Gustafsson L.** Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Rep.* 2004; **5**(5):532-7.
- 30.Pearce AK, Booth IR, Brown AJP.** Genetic manipulation of 6-phosphofructo-1-kinase and fructose 2,6-bisphosphate levels affects the extent to which benzoic acid inhibits the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 2001; **147**: 403-410.
- 31.Petit TD, Jasper A, Kruckeberg AL, Gancedo R, Carlos Van Dam K.** Hexokinase Regulates Kinetics of Glucose Transport and Expression of Genes Encoding Hexose Transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 2000; 182(23): 6815–6818
- 32.Piper P, Mahé Y, Thompson S, Pandjaitan R, Holyoak C, Egner R, Mühlbauer M, Coote P, Kuchler K.** The pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *EMBO J.* 1998; **17**(15):4257-65.

- 33.Randez-Gil F, Herrero P, Sanz P, Prieto JA, Moreno F.** Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localisation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1998; **425**(3):475-8.
- 34.Randez-Gil F, Sanz P, Entian KD, Prieto JA.** Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Mol Cell Biol.* 1998; **18**(5):2940-8.
- 35.Reibstein D, den Hollander JA, Pilkis SJ, Shulman RG.** Studies on the regulation of yeast phosphofructo-1-kinase: its role in aerobic and anaerobic glycolysis. *Biochemistry.* 1986; **25**(1):219-27.
- 36.Reijenga KA, Snoep JL, Diderich JA, van Verseveld HW, Westerhoff HV, Teusink B.** Control of Glycolytic Dynamics by Hexose Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biophysical Journal.* 2001; **80**(2):626–634
- 37.Rodicio R, Strauss A, Heinisch JJ.** Single point mutations in either gene encoding the subunits of the heterooctameric yeast phosphofructokinase abolish allosteric inhibition by ATP. *J Biol Chem.* 2000; **275**(52):40952-60.
- 38.Rodríguez A, De La Cera T, Herrero P, and Moreno F.** The hexokinase 2 protein regulates the expression of the *GLK1*, *HXK1* and *HXK2* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* 2001; **355**(Pt 3): 625–631.

- 39. Rossi G, Sauer M, Porro D, Branduardi P.** Effect of HXT1 and HXT7 hexose transporter overexpression on wild-type and lactic acid producing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Microb Cell Fact.* 2010; **9**:9:15.
- 40. Schaaff I, Heinisch J, Zimmermann FK.** Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. *Yeast.* 1989; **5**(4):285-90.
- 41. Van Den Brink J, Canelas AB, van Gulik WM, Pronk JT, Heijnen JJ, de Winde JH, Daran-Lapujade P.** Dynamics of glycolytic regulation during adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to fermentative metabolism. *Appl Environ Microbiol.* 2008; **74**(18):5710-23.
- 42. Verduyn C, Postma E, Scheffers WA and Van Dijken JP.** Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast.* 1992, **8**(7):501-17.
- 43. Warth AL.** Effect of benzoic acid on glycolytic metabolite levels and intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 1991, **57**(12): 3415–3417.

**44. Moreno Sánchez R, Saavedra E, Mendoza Cózatl D, Rodríguez Enríquez S.** El análisis de control de flujo como herramienta en la manipulación de vías metabólicas. Instituto Nacional de Cardiología. 2005.

**45.** [http://www.sener.gob.mx/webSener/res/PE\\_y\\_DT/pub/Biocombustibles\\_en\\_Mexico\\_Estudio\\_Completo.pdf](http://www.sener.gob.mx/webSener/res/PE_y_DT/pub/Biocombustibles_en_Mexico_Estudio_Completo.pdf)

**46.** BIOCYC Database Collection: <http://biocyc.org/metacyc/index.shtml>

**47.** *Schizosaccharomyces pombe* GeneDB  
(<http://old.genedb.org/genedb/pombe/>)

**48.** *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database  
(<http://www.yeastgenome.org/>)

**49.** Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator  
(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)