



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Mejoramiento genético de una levadura *Saccharomyces cerevisiae* aislada en territorio colombiano para la fermentación de xilosa

Margareth Andrea Patiño Lagos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá D.C., Colombia

2021

Mejoramiento genético de una levadura *Saccharomyces cerevisiae* aislada en territorio colombiano para la fermentación de xilosa

Margareth Andrea Patiño Lagos

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctora en Biotecnología

Director (a):

Doctor Mario Enrique Velásquez Lozano

Codirector (a):

Doctor Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk

Línea de Investigación:

Bioprocesos y Bioprospección

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología

Bogotá D.C., Colombia

2021

“El deseo que le he expresado al buen Dios es el de pasar mi cielo haciendo el bien en la tierra, hasta el fin del mundo. Sí, quiero pasar mi cielo haciendo el bien sobre la tierra”.

Teresa de Lisieux

*A Dios, quién lo es todo en mi vida,
A Alejandro, mi esposo por todo su amor,
A mis padres, Henry y Margarita,
A mis hermanos, Henry Andrés y Camila,
A toda mi familia y amigos.*

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Margareth Andrea Patiño Lagos

Fecha 19/04/2021

Agradecimientos

A Dios porque sin Él nada de esto sería posible, por guiarme, acompañarme y demostrarme su amor en todo momento. A la Santísima Virgen María por su protección.

A mi esposo Jorge Alejandro por su amor, comprensión, apoyo incondicional, compañía, por su escucha, por compartir este amor y gusto por la ciencia y por las buenas conversaciones y discusiones científicas.

A mis padres Henry y Margarita y a mis hermanitos Henry Andrés y Camila Alejandra por su amor, oraciones, palabras de ánimo y apoyo incondicional.

A toda mi familia, abuelos (en especial a mi nonita Cecilia y a mi nonito Elías Q.E.P.D), tíos (en especial a mi tío José y a mi tía Lili), primos, sobrinos del corazón, suegros y cuñados por todo su cariño y apoyo. Algunos se fueron en estos años, pero los tengo presentes en mi corazón.

A la Convocatoria 647 de Colciencias cuyo apoyo económico me permitió realizar este doctorado. A la Universidad Nacional de Colombia por permitirme realizar mis estudios de Doctorado en sus instalaciones.

Al profesor Mario Enrique Velásquez Lozano por la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por sus enseñanzas, por su apoyo, confianza y orientación en este proceso de formación doctoral.

Al profesor Boris Stambuk por la oportunidad de trabajar nuevamente en su grupo de investigación, por su apoyo, enseñanzas, orientación y confianza.

Al Doctorado en Biotecnología, especialmente a la Dra. Sonia Ospina Coordinadora del programa y a Raquel Noguera por su colaboración y ayuda en los diferentes procesos.

A los Laboratorios de Ingeniería Química y Ambiental (LIQ), a todos sus estudiantes (especialmente a Leslie Vanessa Sánchez Castillo, Manuel Alejandro Mayorga y Ana Isabel Ramos) y trabajadores por su apoyo y acogida.

A mis compañeros y amigos del grupo de investigación Yenny Paola Morales Cortés, Diego Hernando Romero Roa, Nicolás Puentes Urrego, Nicolás Correa Sepúlveda, Juan Pablo Ortiz Rosas, Diana Carolina Tusso Pinzón, Angela María García Acero, Iván Felipe Agudelo, Diana Marcela Durán Hernández, Jessica Natalia Torres Leiva, Yina Alejandra Cifuentes Triana, Juan Carlos Quitian Romero, Daniel Augusto Leal Moreno, Carlos Alberto Torres Cañizares y Kelly Marcela Triana Jiménez por su apoyo durante la realización de esta investigación, especialmente a Paolita, Diego, los Nicos, Juan, Dianita T. y Angelita.

A los profesores Pedro Filipe de Brito Brandão, Juan Carlos Serrato Bermúdez y Rubén Darío Godoy Silva por permitirme trabajar en los laboratorios a su cargo.

Al profesor César Hernando Segura de la Universidad de Antioquia y al profesor Rubén Darío Godoy por sus valiosos aportes al proyecto y por haber sido parte de mi Comité Tutorial de evaluación a lo largo del Doctorado.

Al Doctor Fabián Rico Rodríguez por su asesoría y apoyo en los análisis estadísticos.

Al profesor Francisco Román Campos y al grupo de Investigación de Compatibilidad Electromagnética por permitirme trabajar en sus instalaciones y por su bonita acogida, especialmente a mis amigos Betty Herrera Suárez, Jorge Enrique Rodríguez Manrique, Anlly Viviana Peña Aguirre y Carlos Andrés Rivera Guerrero.

A los ingenieros de mantenimiento Edwin Malagón, Víctor Cruz y Fredy Cala por su ayuda en la reparación y mantenimiento de los equipos del laboratorio.

Al señor Gerald Ricardo Cárdenas Estupiñán y a la señora Gloria Inés Gordillo Huertas por su colaboración y ayuda en el proceso de recolección de plásmidos.

Al Grupo de trámites ambientales de la Vicerrectoría de investigación especialmente a Juan Pablo Rosas Morales por toda su ayuda en los trámites de permisos y contrato de acceso a recursos genéticos en el que se enmarca este trabajo.

A los profesores Thiago Olitta Basso y Adriano Azzoni de la Universidade de São Paulo por permitirme trabajar en sus laboratorios durante mi pasantía y a sus estudiantes y grupos de investigación, especialmente a Thiago Machado de Araujo y Rafael da Gama por su acogida y amistad.

Al Dr. Johannes Hegemann de la Universität Düsseldorf por la donación de los plásmidos utilizados en esta investigación.

A todos mis amigos, a los que están cerca y a los que están en otros lugares del mundo por su apoyo, por sus palabras de ánimo, por sus sonrisas, por sus buenos deseos, por sus oraciones, ustedes son un regalo de Dios.

A todas las personas que han contribuido en mi formación y a todos los que directa e indirectamente contribuyeron en este proyecto de investigación.

A todos ustedes, algunos con nombre propio y otros en mi corazón porque son muchos nombres, muchas gracias por sus palabras de ánimo, oraciones y buenos deseos. Dios los siga bendiciendo y les conceda siempre los buenos deseos de sus corazones.

A mis queridas levaduras, que me permitieron manipularlas y trabajar con ellas durante estos años.

A Tito y a Toby no les agradezco porque finalmente no me ayudaron.

Permisos y consideraciones legales

Existe un contrato de acceso a recursos genéticos que ampara la utilización de la cepa de levadura 202-3. CONTRATO MARCO DE ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS Y SUS PRODUCTOS DERIVADOS No. 121. De 2016 – Otrosí No 8 de 2018 – RGE-152-8. PROYECTO: Producción de alcoholes empleando cepas nativas de levaduras colombianas.

La cepa 202-3 se encuentra depositada en el Banco de Cepas y Genes del Instituto de Biotecnología con el código IBUN 090-03602 bajo la certificación IB-159-17 (Anexo A).

Permiso para exportación y/o importación de especímenes de la diversidad biológica no listados en los apéndices de la convención CITES, N°01178 de enero 29 de 2018, Autoridad Nacional de Licencias Ambientales ANLA (Anexo B).

Las modificaciones genéticas realizadas en la cepa nativa 202-3 fueron realizadas con autorización del INVIMA a través de la respuesta derecho de petición 20201055803 Instituto Nacional de Vigilancia de medicamentos y Alimentos – Invima. *No se requiere expedir autorización por parte del CNTSalud para el acceso a recursos genéticos o desempeñar actividades en medio confinado* (Anexo C).

Aval ético de la Facultad de Ciencias (Acta 09-2020), *el Comité considera que el proyecto cumple con los aspectos éticos básicos* (Anexo D).

Mejoramiento genético de una levadura *Saccharomyces cerevisiae* aislada en territorio colombiano para la fermentación de xilosa

Resumen

Saccharomyces cerevisiae es la principal levadura utilizada en biotecnología en todo el mundo, gracias a que su metabolismo y fisiología son conocidos permitiendo su aprovechamiento en diversos procesos industriales. Este microorganismo es excelente en la fermentación de azúcares como las hexosas, sin embargo, ha sido considerado como incapaz de metabolizar pentosas como la arabinosa y la xilosa presentes en la biomasa lignocelulósica. Esta biomasa es una materia prima ampliamente disponible que contiene xilosa, el segundo azúcar más abundante de la naturaleza, en aproximadamente el 35 % de los azúcares totales. Esta fracción de azúcar podría ser aprovechada para la obtención de productos químicos de alto valor agregado como el xilitol. Utilizando ingeniería genética algunos investigadores han obtenido cepas recombinantes de *S. cerevisiae* con capacidad reducida de fermentar xilosa. El Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos de la Universidad Nacional de Colombia realizó el aislamiento de algunos microorganismos obtenidos en Colombia, donde se identificó una cepa de *S. cerevisiae*, denominada como 202-3, que en presencia de hidrolizados lignocelulósicos mostró un consumo de xilosa del 2 % al 5 %, característica que no se encuentra asociada a la especie. En esta investigación se confirmó mediante tres enfoques distintos que la cepa 202-3 efectivamente corresponde a una *S. cerevisiae*: mediante observación morfológica de la cepa por microscopía óptica y de barrido, por amplificación de un fragmento de 150 pb con iniciadores específicos para la especie, y por secuenciación de la región ITS. Su secuencia consenso mostró una similitud superior al 99 % respecto a las secuencias de *S. cerevisiae* reportadas en la base de datos genómica Blastn del NCBI. Experimentalmente, la cepa 202-3 no mostró un mejor consumo de xilosa que otras especies de levaduras analizadas consumidoras de esa pentosa, pero sí una metabolización significativa con un consumo del 9,8 %, lo cual hasta ahora no había sido reportado para ninguna cepa de *S. cerevisiae*. Sin embargo, para mejorar esa capacidad e intentar producir etanol a partir de la xilosa, la cepa 202-3 fue sometida a ingeniería genética y evolutiva. Determinada la ploidía de la cepa, se procedió a silenciar el gen *GAL80* implicado en la represión de los genes *GAL* para que sean expresados continuamente y mejorar la captación y asimilación de esa pentosa. Para las

recombinantes obtenidas los consumos de xilosa fueron de hasta el 18 % con rendimiento de xilitol de hasta 0,407 g/g y no se obtuvo valores significativos de etanol. Mediante ingeniería evolutiva a la cepa parental y a dos recombinantes se obtuvo cepas mejoradas después de ocho inóculos sucesivos de 144 horas cada uno. De la cepa parental 202-3 que consumió 7 % de xilosa, se obtuvo otra cepa que consumió 14 % de xilosa y la producción de xilitol aumentó en 345 % desde 0,236 g en el inóculo inicial a 1,050 g en el final. Con la cepa obtenida de la recombinante R2-MAPL (202-3, *GAL80/gal80Δ::KanMX*) el consumo de xilosa fue de 20 % y la producción de xilitol aumentó 196 % de 0,996 g inicial a 2,951 g final. Con la cepa obtenida de la recombinante B2G-MAPL (202-3, *gal80Δ::KanMX/gal80Δ::Ble'*) el consumo final de xilosa fue de 28 % y la producción de xilitol pasó de 1,115 g inicial a 4,876 g final representando un incremento de 337 %. Estos resultados muestran que las estrategias utilizadas mejoraron el fenotipo de la cepa nativa 202-3 frente al consumo de xilosa y la producción de xilitol.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, xilosa, producción de xilitol, recombinantes, silenciamiento génico, ingeniería evolutiva

Genetic improvement of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast isolated in Colombian territory for xylose fermentation

Abstract

Saccharomyces cerevisiae is the most used yeast in biotechnology throughout the world because its metabolism, and physiology are well known, and it has been widely used in various industrial processes. This microorganism is excellent in the fermentation of sugars such as hexoses. However, it does not metabolize pentoses such as arabinose and xylose which are present in lignocellulosic biomass. This biomass constitutes a widely available raw material, with xylose content, the second most abundant sugar in nature, corresponding to approximately 35 % of total sugars. This sugar fraction could be used to obtain high added value chemical products such as xylitol. Through genetic engineering some researchers have obtained recombinant yeast strains of *S. cerevisiae* with reduced xylose fermentation capability. The research group in Chemical and Biochemical Processes of the Universidad Nacional de Colombia performed the isolation of some microorganisms obtained in Colombia, where a *S. cerevisiae* strain called 202-3 was identified. This strain showed a xylose consumption between 2 % and 5 % in presence of lignocellulosic hydrolysates, characteristic that is not associated with the lineage. In this research, it was confirmed through three different approaches that the 202-3 strain is indeed a *S. cerevisiae*: morphologic strain observation by optical and SEM microscopy, amplification of a 150 bp fragment with species-specific primers, and sequencing its ITS region, whose consensus sequence showed similarity greater than 99 % with the *S. cerevisiae* sequences reported in the NCBI Blastn genomic database. Experimentally, strain 202-3 did not show to be better than other yeast species with the capability to consume xylose, but it did show a significant metabolization of that pentose with a consumption of 9,8 %, which until now had not been reported for *S. cerevisiae*. However, to improve that ability and try to produce ethanol from xylose, the strain was subjected to genetic and evolutionary engineering. Once the ploidy of the strain was determined, the *GAL80* gene involved in the repression of the *GAL* genes was deleted so that they are continuously expressed and improve the uptake and assimilation of the pentose. For the recombinant strains obtained, the xylose consumptions were up to 18 % with a xylitol yield of up to 0,407 g/g and no significant ethanol values were obtained. By evolutionary engineering to the parental strain and to two recombinants, improved stains were obtained

after eight successive inoculum of 144 hours each. From the parental strain 202-3 that consumed 7 % of xylose, another strain was obtained that consumed 14 % of xylose and the xylitol production increased 345 %, from 0,236 g in the initial inoculum to 1,050 g in the final one. With the strain obtained from recombinant R2-MAPL (202-3, *GAL80/gal80Δ::KanMX*), the xylose consumption was 20 % and xylitol production increase 196 %, from 0,996 g initial to 2,951 g final. With the strain obtained from recombinant B2G-MAPL (202-3, *gal80Δ::KanMX/gal80Δ::Ble'*) the final xylose consumption was 28 % and xylitol production went from 1,115 g initial to 4,876 g final, representing a 337 % increase. These results show that the strategies used improved the phenotype of the native strain 202-3 against the consumption of xylose and the production of xylitol.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, xylose, xylitol production, recombinant, gene deleting, evolutionary engineering

Contenido

	Pág.
1. CONSUMO DE XILOSA POR SACCHAROMYCES CEREVISIAE NO RECOMBINANTES.....	33
1.1 FERMENTACIÓN DE PENTOSAS POR <i>S. CEREVISIAE</i>	33
1.2 CRECIMIENTO Y CONSUMO DE XILOSA POR <i>S. CEREVISIAE</i>	36
1.3 TRANSPORTE DE XILOSA POR <i>S. CEREVISIAE</i>	38
1.4 RUTA METABÓLICA EN XILOSA DE <i>S. CEREVISIAE</i>	42
1.5 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE CEPAS <i>S. CEREVISIAE</i> NO RECOMBINANTES QUE USAN XILOSA.....	45
1.6 MEJORAMIENTO DE LA UTILIZACIÓN DE XILOSA POR CEPAS <i>S. CEREVISIAE</i>	49
1.7 CONCLUSIONES.....	52
2. PERFIL FENOTÍPICO EN XILOSA DE LA CEPA SACCHAROMYCES CEREVISIAE 202-3	53
2.1 MATERIALES Y MÉTODOS	54
2.1.1 <i>Microorganismos</i>	54
2.1.2 <i>Medio de cultivo</i>	54
2.1.3 <i>Microscopía óptica y de barrido</i>	55
2.1.4 <i>Extracción de ADN genómico de levaduras</i>	56
2.1.5 <i>Reacción en cadena de la polimerasa PCR</i>	56
2.1.6 <i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	56
2.1.7 <i>Identificación de especie usando iniciadores específicos</i>	56
2.1.8 <i>Confirmación de especie por secuenciación de las regiones ITS</i>	57
2.1.9 <i>Concentración celular</i>	58
2.1.10 <i>Crecimientos y fermentaciones</i>	58
2.1.11 <i>Determinación de biomasa celular</i>	60
2.1.12 <i>Cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC</i>	61
2.1.13 <i>Amplificación genes involucrados en la metabolización de xilosa</i>	61
2.1.14 <i>Amplificación gen XDH1</i>	62
2.1.15 <i>Determinación de ploidía en levaduras</i>	62
2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63
2.2.1 <i>Crecimiento y observación microscópica cepa 202-3</i>	63
2.2.2 <i>Confirmación de la especie usando iniciadores específicos</i>	67
2.2.3 <i>Secuenciación de las regiones ITS</i>	68
2.2.4 <i>Crecimientos y parámetros cinéticos de cinco levaduras</i>	69
2.2.5 <i>Comparación comportamiento cinético de la cepa 202-3 en diferentes recipientes</i>	75
2.2.6 <i>Caracterización fenotípica de la cepa <i>S. cerevisiae</i> 202-3 en diferentes condiciones</i>	77
2.2.7 <i>Amplificación de los genes involucrados en la metabolización de xilosa en la cepa 202-3</i>	866
2.2.8 <i>Determinación de ploidía de la levadura</i>	87

2.2.9	<i>Conclusiones</i>	89
3.	SILENCIAMIENTO DEL GEN <i>GAL80</i>	91
3.1	MATERIALES Y MÉTODOS	91
3.1.1	<i>Microorganismos, plásmidos y medios de cultivo</i>	91
3.1.2	<i>Preparación de células competentes bacterianas</i>	92
3.1.3	<i>Transformación de bacterias</i>	92
3.1.4	<i>Extracción de ADN plasmídico de bacterias</i>	93
3.1.5	<i>Diseño de iniciadores para el silenciamiento de <i>GAL80</i></i>	93
3.1.6	<i>PCR para generar el casete de disrupción</i>	96
3.1.7	<i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	97
3.1.8	<i>Purificación del ADN del gel de agarosa</i>	97
3.1.9	<i>Preparación de células competentes de levaduras</i>	97
3.1.10	<i>Extracción de ADN genómico de levaduras</i>	97
3.1.11	<i>Transformación de las levaduras</i>	97
3.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	98
3.2.1	<i>Obtención de transformantes bacterianas con los plásmidos que se usarán en los módulos de silenciamiento de genes</i>	98
3.2.2	<i>Obtención de módulos de silenciamiento</i>	99
3.2.3	<i>Obtención de recombinantes</i>	101
3.2.4	<i>Verificación de recombinantes</i>	101
3.2.5	<i>Conclusiones</i>	111
4.	INGENIERÍA EVOLUTIVA EN LA CEPA 202-3 Y RECOMBINANTES	113
4.1	MATERIALES Y MÉTODOS	113
4.1.1	<i>Experimento de ingeniería evolutiva</i>	113
4.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	114
4.2.1	<i>Ingeniería evolutiva</i>	114
4.3	CONCLUSIONES.....	119
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	121
5.1	CONCLUSIONES.....	121
5.2	RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS.....	122

Lista de figuras

Figura 1-1 – Fermentación de la pentosa (D-xilulosa) por <i>S. cerevisiae</i>	34
Figura 1-2 – Vía de utilización de D-xilosa en <i>S. cerevisiae</i>	37
Figura 2-1 – Representación de frascos utilizados..	59
Figura 2-2 – Representación de los matraces de Erlenmeyer..	60
Figura 2-3 – Crecimiento de la cepa 202-3 usando como única fuente de carbono xilosa..	65
Figura 2-4 – Observación por microscopía óptica de la cepa 202-3..	65
Figura 2-5 – Micrografías obtenidas por observación SEM.....	67
Figura 2-6 – Resultados de identidad del análisis de la secuencia consenso.....	69
Figura 2-7 – Crecimientos de las cepas <i>S. stipitis</i> , 202-3, Q1, 116-3 y 116-5..	70
Figura 2-8 – Crecimientos de las cepas en 20 g/L de glucosa, consumo del azúcar y producción de glicerol y etanol..	71
Figura 2-9 – Crecimientos de las cepas en 20 g/L de xilosa, consumo del azúcar y producción de xilitol.....	72
Figura 2-10 – Crecimientos de las cepas de levaduras en 20 g/L de xilosa y 20 g/L de glucosa, consumo de los azúcares, producción de xilitol, glicerol y etanol.....	74
Figura 2-11 – Relación de la cepa 202-3 en diferentes recipientes condición A (frasco taparosca) y condición E (Erlenmeyer) en medio YPD [20 g/L glucosa].	76
Figura 2-12 – Relación de la cepa 202-3 en diferentes recipientes condición B (frasco taparosca) y condición F (Erlenmeyer) en medio YPX [20 g/L xilosa].	76
Figura 2-13 – Relación de la cepa 202-3 en diferentes recipientes condición C (frasco taparosca) y condición G (Erlenmeyer) en medio YPDX [10 g/L glucosa+10 g/L xilosa].	77
Figura 2-14 – Crecimiento de la cepa 202-3 en glucosa en condiciones microaerobias..	79
Figura 2-15 – Consumo de xilosa y producción de xilitol por la cepa 202-3.....	80
Figura 2-16 – Consumo de glucosa+xilosa por la cepa 202-3 en medio YPDX.....	81
Figura 2-17 – Crecimiento de la cepa 202-3 en medio Verduyn.....	81
Figura 2-18 – Fermentación de la cepa 202-3 en hidrolizados.....	82
Figura 2-19 – Crecimiento de la cepa 202-3 en medio Verduyn 10 g/L de xilosa, aerobio, anaerobio y microaerobio.....	84
Figura 2-20 – Crecimiento de la cepa 202-3 en biorreactor en medio Verduyn 20 g/L de xilosa.....	85
Figura 2-21 – Crecimiento de la cepa 202-3 en dos biorreactores.....	85
Figura 2-22 – Amplificación de los genes involucrados en la metabolización de xilosa en <i>S. cerevisiae</i> 202-3.....	86
Figura 2-23 – Amplificación del gen <i>XDH1</i> en <i>S. cerevisiae</i> 202-3.....	87
Figura 2-24 – Gel de electroforesis analizando la ploidía de las levaduras.....	87

Figura 2-25 – Resultados citometría de flujo.	88
Figura 3-1 – Ubicación del gen <i>GAL80</i> en el cromosoma XIII de <i>S. cerevisiae</i>	93
Figura 3-2 – Estrategia construcción módulos de silenciamiento gen <i>GAL80</i>	100
Figura 3-3 – Gel de electroforesis que confirma la construcción de los módulos de silenciamiento del gen <i>GAL80</i>	101
Figura 3-4 – Verificación de recombinantes usando iniciadores de verificación lejos. ...	102
Figura 3-5 – Verificación de recombinantes.	103
Figura 3-6 – Verificación de recombinantes del módulo <i>Ble^r</i> con iniciadores de verificación “LEJOS”.	104
Figura 3-7 – Electroforesis de verificación de recombinantes con el módulo <i>Ble^r</i> usando iniciadores de verificación “LEJOS”.	105
Figura 3-8 – Verificación de recombinantes con el módulo <i>Ble^r</i> con iniciadores de verificación lejos.....	105
Figura 3-9 – Verificación de recombinantes con el módulo <i>Ble^r</i> con iniciadores F-BLE y R-VER. LEJOS.	106
Figura 3-10 – Verificación de recombinantes con el módulo <i>Ble^r</i> con iniciadores F-V. D. y R-V. L.	106
Figura 3-11 – Verificación de silenciamiento completo del gen <i>GAL80</i>	107
Figura 3-12 – Micrografía SEM de las cepas recombinantes.	108
Figura 3-13 – Gel de electroforesis que muestra la amplificación de las regiones ITS en las cepas analizadas.....	108
Figura 3-14 – Amplificación <i>mating</i> en las cepas	109
Figura 3-15 – Asimilación de xilosa en la cepa parental y recombinantes en YPX 20 g/L de xilosa.....	109
Figura 4-1 – Diagrama experimento ingeniería evolutiva.	114
Figura 4-2 – Ingeniería evolutiva en la cepa parental y en las cepas recombinantes. ...	116
Figura 4-3 – Ingeniería evolutiva comparación cepa 202-3, recombinante R2-MAPL y recombinante B2G-MAPL.	117
Figura 4-4 – Ingeniería evolutiva comparación cepa parental 202-3 y cepa recombinante evolucionada B2G-MAPL.....	118

Lista de tablas

	PÁG.
Tabla 1-1 – Afinidad de los transportadores de hexosas de <i>S. cerevisiae</i> por xilosa o glucosa.....	41
Tabla 1-2 – Genes que codifican para las enzimas metabólicas de la xilosa en <i>S. cerevisiae</i>	43
Tabla 2-1 – Condiciones de PCR para obtener los fragmentos de la región ITS en levaduras.....	57
Tabla 2-2 – Secuencia de iniciadores para amplificación de los genes involucrados en la metabolización de xilosa	62
Tabla 2-3 – Mezcla de reacción de PCR para la amplificación de MATa y MAT α	63
Tabla 2-4 – Resultados extracción de ADN genómico para la cepa 202-3	68
Tabla 2-5 – Parámetros cinéticos de las levaduras: <i>S. stipitis</i> , 202-3, 116-3, 116-5 y Q1 en glucosa.....	71
Tabla 2-6 – Parámetros cinéticos de las cepas <i>S. stipitis</i> , 202-3, 116-3, 116-5 y Q1 en xilosa.....	73
Tabla 2-7 – Parámetros cinéticos de las cepas <i>S. stipitis</i> , 202-3, 116-3, 116-5 y Q1 en glucosa+xilosa.....	75
Tabla 2-8 – Parámetros cinéticos de consumo de glucosa por la cepa 202-3.	79
Tabla 2-9 – Parámetros cinéticos de crecimiento de la cepa 202-3 en xilosa en condiciones microaerobias y anaerobias.....	80
Tabla 2-10 – Parámetros cinéticos de crecimiento de la cepa 202-3 en glucosa+xilosa.	83
Tabla 2-11 – Parámetros cinéticos de la cepa 202-3 en los biorreactores.....	85
Tabla 3-1 – Plásmidos utilizados para la construcción de los módulos de silenciamiento.....	92
Tabla 3-2 – Secuencia de iniciadores para las estrategias de silenciamiento del gen <i>GAL80</i> en la levadura <i>S. cerevisiae</i> 202-3.....	95
Tabla 3-3 – Mezcla de reacción de PCR para la obtención de casetes de silenciamiento gen <i>GAL80</i> (NEB 2017).....	96
Tabla 3-4 – Condiciones PCR para generación casete silenciamiento <i>GAL80</i>	96
Tabla 3-5 – Resultados extracción de ADN de los plásmidos pUG6 y pUG66.....	98
Tabla 3-6 – Descripción recombinantes obtenidas con módulo <i>KanMX</i>	103
Tabla 3-7 – Descripción recombinante obtenida con silenciamiento completo del gen <i>GAL80</i>	107

Tabla 3-8 – Parámetros cinéticos de la asimilación de xilosa por las cepas 202-3, R1-MAPL, R2-MAPL y B2G-MAPL.	110
Tabla 3-9 – Resumen de resultados para las cepas 202-3, R2-MAPL y B2G-MAPL.....	111
Tabla 4-1 – Descripción cepas obtenidas por evolución adaptativa.	115
Tabla 4-2 – Resumen de resultados más significativos de las cepas obtenidas por evolución adaptativa.	119
Tabla 5-1 – Mezcla transformación método químico.	154
Tabla 5-2 – Preparación solución de lisis III	155
Tabla 5-3 – Preparación Tris-Cl.	155

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI
Abs_{600}	Absorbancia a 600 nanómetros	adimensional
\approx, \sim	Aproximadamente	
$^{\circ}C$	Grados Celsius	$^{\circ}C$
G	Gramo	kg
<i>GAL</i>	Familia de genes que codifican para proteínas transportadoras de galactosa	
H	Hora	3600 s
<i>HXT</i>	Familia de genes que codifican para proteínas transportadoras de hexosas	
kb	Kilobase	
kPa	Kilopascal	1000 Pa
Lb	Libra	0,4536 kg
lbf/in ²	Presión de esterilización	6,8948 kPa
L	Litro	$10^{-3} m^3$
mL	Mililitro	$10^{-6} m^3$
mM	Milimolar	$1 mol/m^3$
m s. n. m	Metros sobre el nivel del mar	m
mV	Milivoltios	mV
min	Minuto	60 s

Símbolo	Término	Unidad SI
M	Molar	10^3 mol/m^3
Ng	Nanogramo	10^{-12} kg
Rpm	Rotaciones por minuto	1/60 Hz
S	Segundo	s
U	Unidad	
$Y_{X/S}$	Rendimiento de sustrato a biomasa g de biomasa/g de sustrato	g/g
$Y_{P/S}$	Rendimiento de sustrato a producto g de producto/g de sustrato	g/g
$Y_{Xil/S}$	Rendimiento de sustrato a xilitol g de xilitol/g de sustrato	g/g
$Y_{GII/S}$	Rendimiento de sustrato a glicerol g de glicerol/g de sustrato	g/g
$Y_{ETOH/S}$	Rendimiento de sustrato a etanol g de etanol/g de sustrato	g/g
Qp	Productividad volumétrica de etanol	g/L.h
Px	Productividad en biomasa	g/L.h

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
μl	Microlitro
μ	Velocidad de crecimiento
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidad máxima de crecimiento

Abreviaturas

Abreviatura	Término
2G	Etanol de segunda generación
ADH	Alcohol deshidrogenasa

Abreviatura Término

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato 3', 5'cíclico
BLAST	Del inglés Basic Local Aligment Search Tool
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato (del inglés <i>Deoxynucleotide Triphosphate</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>gal80Δ</i>	<i>GAL80</i> silenciado
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
GTE	Glucosa-Tris-EDTA
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (del inglés <i>High performance liquid chromatography</i>)
<i>HXT</i>	Transportador de hexosa (del inglés <i>Hexose Transporter</i>)
kb	Kilobase (equivale a 1000 pares de bases nitrogenadas)
LB	Medio Luria-Bertani
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida
NCBI	Del inglés National Center for Biotechnology Information
nt	Nucleótidos
pb	Pares de bases nitrogenadas
p/v	Relación peso-volumen
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polietilenglicol

Abreviatura Término

pH	Potencial de Hidrógeno
PIPES	Piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfónico)
SC	Medio sintético
SEM	Microscopio Electrónico de Barrido (del inglés <i>Scanning Electron Microscope</i>)
SDS	Dodecilsulfato de Sódico
SGD	Del inglés <i>Saccharomyces Genome Database</i> , base de datos disponible en el sitio www.yeastgenome.org
T	Tiempo
TRIS-HCl	<i>Buffer</i> tris (hidroximetil) aminometano
XDH	Xilitol Deshidrogenasa
XI	Xilosa Isomerasa
XR	Xilosa Reductasa
XK	Xilulosa Quinasa
XYL1	Gen que codifica la Xilosa Reductasa
XYL2	Gen que codifica la Xilitol Deshidrogenasa
XKS1	Gen que codifica la Xilulosa Quinasa
YP	Medio Rico
YPD	Medio Rico con glucosa como fuente de carbono
YPDX	Medio Rico con xilosa y glucosa como fuente de carbono
YPX	Medio Rico con xilosa como fuente de carbono

Introducción

Las levaduras son organismos eucariotas, clasificados como hongos microscópicos que crecen como células individuales (Kurtzman, Fell y Boekhout, 2011). Estos microorganismos se han empleado en la producción de bebidas alcohólicas por miles de años (Hammond, 2003). Las levaduras proporcionan un sistema genético flexible y rápido para el estudio de eventos celulares. Con un tiempo aproximado de generación de 90 minutos, se producen colonias que contienen millones de células después de sólo 2 días de crecimiento. Pueden propagarse tanto en la forma haploide como diploide, facilitando su análisis genético. Las levaduras haploides pueden ser mutadas para tener requerimientos nutricionales específicos o fenotipos genéticos auxótrofos, los cuales permiten realizar modificaciones genéticas utilizando diversos marcadores de selección (Grunstein y Gasser, 2013).

Las levaduras principalmente de origen industrial se han entrecruzado ampliamente para la obtención de células diploides saludables capaces de esporular y producir cuatro ascosporas viables. La cepa *S. cerevisiae* S288C es la cepa modificada genéticamente más utilizada en estudios de laboratorio a nivel mundial. Esta cepa se produjo en los años 1950 y más del 85% de su genoma nuclear se deriva de una cepa de levadura de vino encontrada en la descomposición de higos en California en 1938 (Mortimer y Johnston, 1986).

S. cerevisiae es una levadura reconocida como segura (*Generally Recognized as Safe – GRAS*) para su uso en alimentos (Lin y Tanaka, 2006), excelente fermentadora de azúcares para producir etanol, tanto en la presencia de oxígeno como en la ausencia de este, tolera bien su producto de fermentación (más del 15% de etanol), soporta condiciones de acidez, variaciones de temperaturas y estrés osmótico (Reis, 2012). Es el microorganismo más utilizado en la producción de etanol de segunda generación a partir de hidrolizados de lignocelulosa (Zhang, Rodriguez y Keasling, 2011) presentando una elevada resistencia a los compuestos inhibitorios producidos en los hidrolizados

lignocelulósicos, pudiendo convertir compuestos fenólicos en compuestos menos tóxicos (Jönsson, Alriksson y Nilvebrant, 2013). Sin embargo, esta levadura no puede metabolizar eficientemente pentosas como la xilosa y arabinosa, presentes en la abundante biomasa lignocelulósica. La xilosa es el segundo azúcar más abundante en la naturaleza, disponible en los hidrolizados lignocelulósicos. Dado que *S. cerevisiae* posee una baja expresión de los genes que codifican para las enzimas xilosa reductasa (XR), xilitol deshidrogenasa (XDH) y xilulosa quinasa (XK), se considera incapaz de metabolizar xilosa (Li *et al.*, 2016; McIlwain *et al.*, 2016; Sato *et al.*, 2016; Turner *et al.*, 2016). Aunque existen estudios que muestran que la sobreexpresión de estos genes en levaduras *S. cerevisiae* permiten una mejor asimilación de xilosa, la eficiencia y las velocidades de fermentación han sido reportadas como reducidas (Moysés *et al.*, 2016) y aún deben ser mejoradas para su uso viable a nivel industrial. Esto ha abierto un amplio campo de investigación en la búsqueda de cepas con la habilidad de fermentar pentosas para el aprovechamiento completo de los azúcares disponibles en la biomasa lignocelulósica en la obtención de productos químicos de alto valor agregado como alcoholes, enzimas y químicos finos entre otros (Howard *et al.*, 2003).

El grupo de investigación de Procesos Químicos y Bioquímicos de la Universidad Nacional de Colombia por medio del proyecto titulado “Aislamiento, caracterización y evaluación de cepas nativas del Municipio de Puerto López (Meta) para la producción de etanol”, aisló en 2010 una cepa de levadura que presentó un consumo modesto de xilosa y que presentaba características similares a las levaduras *S. cerevisiae*. En el trabajo de (Cifuentes, 2016) se realizó una secuenciación inicial de esta cepa 202-3 y se caracterizó su genoma, proponiendo posibles genes candidatos asociados al consumo de xilosa.

Considerando las observaciones preliminares del consumo de xilosa por esta cepa y su potencial para la utilización de esta pentosa, en esta investigación se realizó el análisis y caracterización fenotípica para el consumo de xilosa. Se aplicaron metodologías de ingeniería genética y metabólica en levaduras para su mejoramiento de acuerdo con el propósito de la investigación.

En este sentido, el objetivo general de esta investigación fue obtener recombinantes de la cepa aislada en territorio colombiano *Saccharomyces cerevisiae* 202-3 que presenten una mejor asimilación de xilosa. Los objetivos específicos se citan a continuación:

- Establecer el perfil fenotípico en consumo de xilosa de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* 202-3.

- Determinar el efecto del silenciamiento del gen *GAL80* en la metabolización de xilosa en la cepa *Saccharomyces cerevisiae* 202-3.
- Determinar los parámetros fermentativos para las cepas recombinantes obtenidas usando xilosa como fuente de carbono.
- Realizar ingeniería evolutiva en la cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae* 202-3 y recombinantes usando xilosa como fuente de carbono.

En este trabajo se confirmó el linaje de la cepa 202-3 y que tiene la habilidad de consumir xilosa. Se obtuvieron cepas recombinantes con una y dos copias del gen *GAL80* silenciado (*gal80Δ*) y se obtuvieron cepas mejoradas por ingeniería evolutiva que presentaron un aumento considerable en el consumo de xilosa, así como una mayor producción de xilitol comparada con la parental.

En el primer capítulo se hace una revisión del consumo de xilosa por cepas *S. cerevisiae* no recombinantes, es decir, como la cepa 202-3 aislada de un ambiente natural. Se describe la fermentación, el crecimiento y consumo, el transporte, la ruta metabólica, el análisis transcriptómico y la mejora de utilización de xilosa por este tipo de levaduras.

En el segundo capítulo se muestran los resultados de la confirmación de la especie por medio de la observación morfológica a través de microscopía óptica y de barrido (SEM), se realizó un análisis de especie específico utilizando iniciadores (*primers*) que permiten identificar especies del clado *Saccharomyces*, se realizó secuenciación de la región ITS que mostró una similitud superior al 99 % de la cepa 202-3 respecto a las secuencias de *S. cerevisiae* reportadas en la base de datos genómica Blastn del NCBI. Se analizó el perfil fenotípico de la cepa 202-3 en xilosa. Los resultados confirman que la cepa 202-3 presenta un modesto consumo de xilosa y producción de xilitol haciéndola una candidata muy interesante de mejoramiento genético, teniendo en cuenta que esta no es una característica de este linaje de levadura. Como se consideró silenciar el gen *GAL80*, por amplificación de *mating* y citometría de flujo se determinó que la cepa es diploide con el fin de establecer las copias de dicho gen en el microorganismo.

En el tercer capítulo se describe la metodología para el silenciamiento del gen *GAL80* en la cepa 202-3, la obtención y verificación de recombinantes obtenidas y se determinan los parámetros fermentativos usando xilosa como fuente de carbono. *GAL80* codifica para un represor transcripcional de los genes *GAL* en ausencia de galactosa inhibiendo la

activación transcripcional de Gal4. Se obtuvieron cepas recombinantes que muestran un mejor consumo de xilosa con relación a la cepa parental y una mayor producción de xilitol.

En el cuarto capítulo se describe la ingeniería evolutiva que se realizó con la cepa parental 202-3 y con las cepas recombinantes R2-MAPL (202-3, *GAL80/gal80Δ::KanMX*) y B2G-MAPL (202-3, *gal80Δ::KanMX/gal80Δ::Ble'*). Las cepas obtenidas por evolución adaptativa mostraron consumos considerablemente mayores de xilosa y producción de xilitol frente a la cepa parental.

En el quinto capítulo se presentan las conclusiones de los resultados de este trabajo y las recomendaciones para futuras investigaciones. Finalmente se encuentran los anexos y la bibliografía utilizada en el desarrollo de la tesis.

1. Consumo de xilosa por *Saccharomyces cerevisiae* no recombinantes

Basado en el artículo de revisión publicado por Margareth Andrea Patiño, Juan Pablo Ortiz, Mario Velásquez, y Boris U. Stambuk, **D-Xylose consumption by nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae*: A review.** *Yeast.* 2019; 36:541–556. <https://doi.org/10.1002/yea.3429>

1.1 Fermentación de pentosas por *S. cerevisiae*

La xilulosa es la única pentosa que puede ser fermentada por *S. cerevisiae* (Chiang *et al.*, 1981; Jeppsson, Yu y Hahn-Hägerdal, 1996; Suihko y Poutanen, 1984; Wang y Schneider 1980; Wang, Shopsis, y Schneider, 1980; Yu, Jeppsson, y Hahn-Hägerdal, 1995). Esto es posible porque esta levadura tiene una xiluloquinasa funcional (XK) que fosforila la xilulosa en xilulosa-5-fosfato la cual ingresa a la parte no oxidativa de la vía de las pentosas fosfato, y finalmente a la glucólisis, como se muestra en la Figura 1-1. El gen que codifica XK de *S. cerevisiae* (*XKS1*) se aisló mediante la complementación de un XK mutante de *Escherichia coli* (Chang y Ho, 1988; Ho y Chang, 1989), y más tarde se demostró que se encuentra en el cromosoma VII (ORF YGR194C) de *S. cerevisiae* (Richard, Toivari y Penttilä, 1999; Rodríguez-Peña *et al.*, 1998). Esta enzima es el paso que limita la velocidad en la fermentación de xilulosa por *S. cerevisiae*, y su sobreexpresión aumenta el consumo de xilulosa y la fermentación por las células de levadura (Deng y Ho, 1990; Lee *et al.*, 2003; Richard, Toivari y Penttilä, 2000). Además de XK, la vía no oxidativa de la pentosa fosfato también controla la velocidad de fermentación de la xilulosa y la sobreexpresión de las cuatro enzimas involucradas (ribulosa-5-fosfato epimerasa codificada por el gen *RPE1*, ribosa-5-fosfato cetoisomerasa codificada por el gen *RKI1*, transaldolasa codificada por el gen *TAL1* y transcetolasa codificada por el gen *TKL1*) aumenta significativamente el consumo de xilulosa y la fermentación por las células de levadura (Johansson y Hahn-Hägerdal, 2002). Aunque la xilulosa es un azúcar raro en la naturaleza (Granström *et al.*, 2004), la capacidad de *S. cerevisiae* para fermentar esta pentosa ha atraído una atención considerable ya que la xilosa presente en la biomasa lignocelulósica puede ser

isomerizada en xilulosa mediante la adición de xilosa (glucosa) isomerasa comercial al medio (una enzima bacteriana utilizada en la producción industrial de jarabe alto en fructosa), permitiendo la fermentación de esta abundante fuente de carbono (De Bari *et al.*, 2014; Gong *et al.*, 1981; Hahn-Hägerdal, Berner y Skoog, 1986; Lindén y Hahn-Hägerdal, 1989; Milessi *et al.*, 2018; Rao *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2011; 2012).

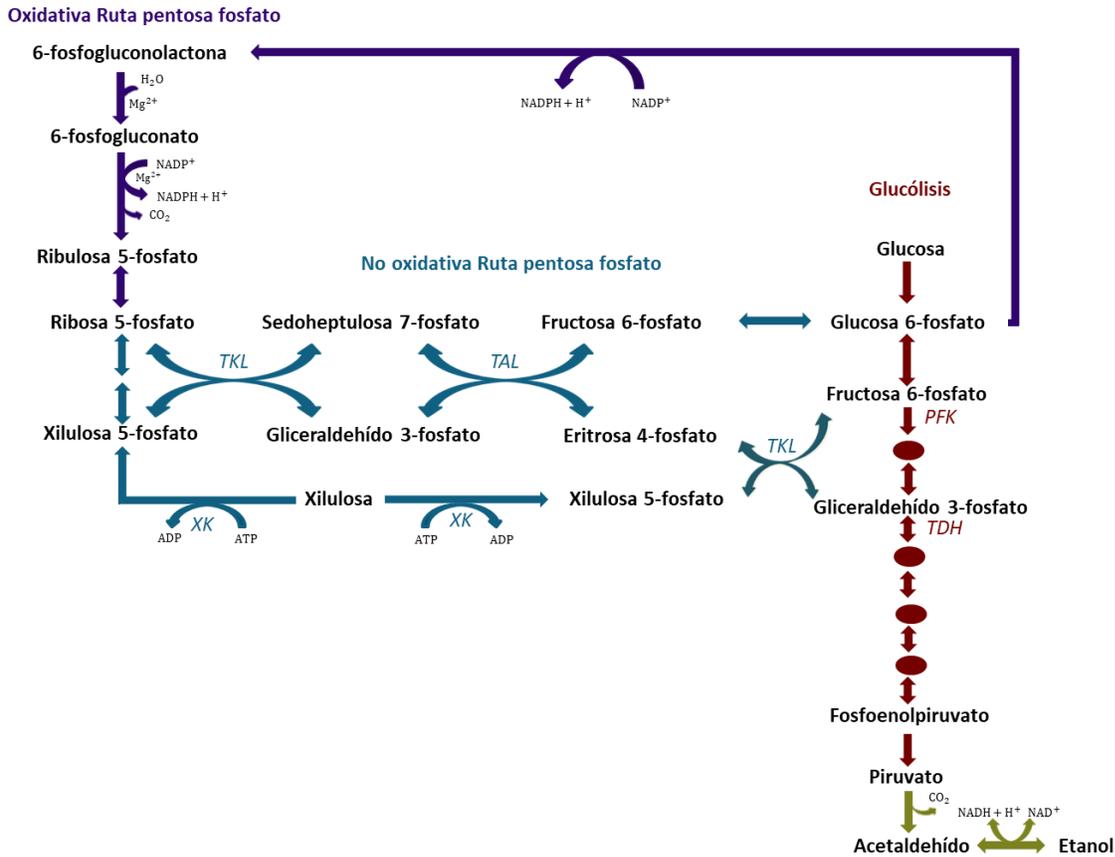


Figura 1-1 – Fermentación de la pentosa (D-xilulosa) por *S. cerevisiae*. Xilulosa es fosforilada por xiluloquinasa (XK), y xilulosa 5-fosfato por la acción de la transcetolasas (TKL) y transaldolasas (TAL) en la parte no oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato (PPP), es convertida en fructosa 6-fosfato y glicerinaldehído 3-fosfato que finalmente entra a la glucólisis a través de la acción de la fosfofructoquinasa (PFK) y glicerinaldehído 3-fosfato deshidrogenasas (TDH), permitiendo la producción de etanol.

Sin embargo, las tasas de crecimiento celular, consumo de xilulosa y producción y rendimiento de etanol de esta fuente de carbono son significativamente bajas en comparación con los resultados obtenidos de la fermentación de otros azúcares por *S. cerevisiae*, como glucosa o galactosa (Jeppsson, Yu, y Hahn-Hägerdal, 1996; Mittelman y Barkai, 2017; Tamari *et al.*, 2014; Yu, Jeppsson, y Hahn-Hägerdal, 1995). De hecho, existe una amplia variación fenotípica en la capacidad de las cepas de *S. cerevisiae* para consumir y fermentar xilulosa (Eliasson *et al.*, 2000; Matsushika *et al.*, 2009; Mittelman y

Barkai, 2017; Tamari *et al.*, 2014; Yu, Jeppsson, y Hahn-Hägerdal, 1995), que podría ser en parte explicado por las diferencias en la regulación génica global, incluidas las variaciones en histonas deacetilasas (Tamari *et al.*, 2016). El análisis del transcriptoma indica que los bajos rendimientos de etanol obtenidos durante el crecimiento en xilulosa se dan probablemente como consecuencia de una mayor expresión de genes respiratorios, incluidos genes del ciclo TCA, fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones y gluconeogénesis, durante el crecimiento en esta pentosa (en comparación con las células cultivadas en glucosa), que se correlaciona con los primeros resultados que indican que la actividad mitocondrial fue necesaria para el metabolismo de la xilulosa por las células de levadura (Maleszka y Schneider, 1984). Una inducción de genes de biosíntesis de aminoácidos ocurrió solo en presencia de xilulosa, que fue no correlacionada con la tasa de crecimiento en esta fuente de carbono, a pesar de la presencia de aminoácidos en el medio de crecimiento (Mittelman y Barkai, 2017; Tamari *et al.*, 2014).

Como es el caso de otros azúcares fermentables, el crecimiento de xilulosa puede mejorar significativamente a través de la ingeniería evolutiva mediante la propagación en serie de cepas de levadura de *S. cerevisiae* durante ~ 300 generaciones en medios que contienen xilulosa (Tamari *et al.*, 2016). Las cepas evolucionadas y mejoradas mostraron pérdida de la inducción del gen de biosíntesis de aminoácidos por la xilulosa, fuertemente correlacionada con la mejora en la tasa de crecimiento, lo que sugiere que el agotamiento interno de aminoácidos presentó un cuello de botella importante que limita el crecimiento en esta pentosa (Tamari *et al.*, 2016). Un análisis de la fermentación de xilulosa por 411 mutantes metabólicos y reguladores asociados con el metabolismo del carbono central (cepas con genes silenciados o heterocigotos no esenciales o esenciales, respectivamente) reveló que se requerían 55 genes para el crecimiento de xilulosa, siendo 30 de ellos también necesarios para el crecimiento en galactosa y otros 21 necesarios para el crecimiento en glicerol (Mittelman y Barkai, 2017). De hecho, la mayoría de estos 51 genes están involucrados en el crecimiento en fuentes de carbono que son respiradas y, por lo tanto, solo cuatro genes (*TKL1*, *TAL1*, *PFK2* y *TDH1*) son específicamente necesarios para el crecimiento en xilulosa, lo que confirma que las enzimas de la vía de las pentosas fosfato y las enzimas que unen esta vía a la glucólisis (Figura 1-1) son esenciales para el crecimiento de xilulosa.

Finalmente, estos autores también encontraron 10 genes que, cuando se silenciaron, produjeron cepas con niveles de etanol de tipo salvaje pero con niveles más bajos de

biomasa, lo que indica una mayor productividad específica de etanol durante el crecimiento con xilulosa (no observado durante el crecimiento con glucosa o galactosa). Por ejemplo, el silenciamiento del gen *IRA2*, que codifica una proteína activadora de GTPasa necesaria para reducir los niveles de AMPc en condiciones limitantes de nutrientes, promovió un aumento de ~ 50% en la producción específica de etanol de xilulosa, lo que indica que un aumento en los niveles de AMPc intracelular en la cepa *ira2Δ* tiene un efecto positivo en la fermentación de xilulosa. Desafortunadamente, estos interesantes resultados de claras implicaciones biotecnológicas no se han explorado más a fondo (Mittelman y Barkai, 2017).

Otro tema que no ha sido explorado es cómo la xilulosa ingresa a la célula de levadura, y aunque es asumido que la xilulosa es probablemente transportada por transportadores de azúcar (tipo hexosa), una cepa *hxt-null* con los principales transportadores de hexosas presentes en *S. cerevisiae* silenciados (*HXT1* a *HXT7*) es capaz de consumir xilulosa con tasas que corresponden a > 50% de los observados en cepas de tipo salvaje (Hohenschuh, Hector y Murthy, 2015), sugiriendo que la captación de xilulosa probablemente esté mediada por otras permeasas presentes en las células de levadura. De hecho, en solución la forma de cadena abierta de la xilulosa se cicla para formar α - o β -D-xilulofuranosa (Figura 1-2), la cual es diferente de los anillos de piranosa formados por hexosas (o xilosa) en solución, la estructura reconocida y transportada por permeasas canónicas de *HXT*.

1.2 Crecimiento y consumo de xilosa por *S. cerevisiae*

Aunque es generalmente aceptado que *S. cerevisiae* es una especie de levadura conocida como incapaz de asimilar la xilosa (Barnett, Payne y Yarrow, 1990), los primeros estudios mostraron que varias cepas de *Saccharomyces* pueden consumir algo de xilosa (Gong *et al.*, 1983; Hsiao *et al.*, 1982), con una amplia variación fenotípica en la capacidad de esta levadura para consumir la pentosa. Por ejemplo, Gong y colaboradores (1983) analizaron la capacidad de 21 levaduras *Saccharomyces* de diferentes cepas y especies, que no pueden crecer en xilosa, para consumir 50 g/L xilosa en medios enriquecidos. Aunque la mayoría de ellas consumieron solo 0,1 a 0,5 g/L de xilosa en 3 días, una cepa de *S. cerevisiae* (ATCC 26497) fue capaz de consumir 1,6 g/L de xilosa aeróbicamente en el mismo período de tiempo, produciendo xilitol como producto principal. La conocida cepa de laboratorio BY4741 también puede consumir hasta 2 g/L de xilosa en 10 días (produciendo xilitol) a partir de una concentración inicial de 40 g/L (Träff, Jönsson y Hahn-Hägerdal, 2002). El análisis de otras cuatro cepas, capaces de consumir xilosa

aeróbicamente, reveló que la presencia de otros sustratos (azúcares, ácidos orgánicos, polioles o etanol), o incluso extracto de levadura, mejoró significativamente el consumo de xilosa aeróbica por las células: de 3-7 g/L de xilosa fueron consumidos en 6 días, a partir de una concentración inicial de 10 g/L. El uso de ¹⁴C-xilosa radiomarcada como sustrato reveló que más del 91% del marcador se convirtió en xilitol y menos del 2% en biomasa, lo que indica que el azúcar no fue asimilado por las células de *S. cerevisiae* (Batt *et al.*, 1986; Van Zyl *et al.*, 1989; van Zyl *et al.*, 1993).

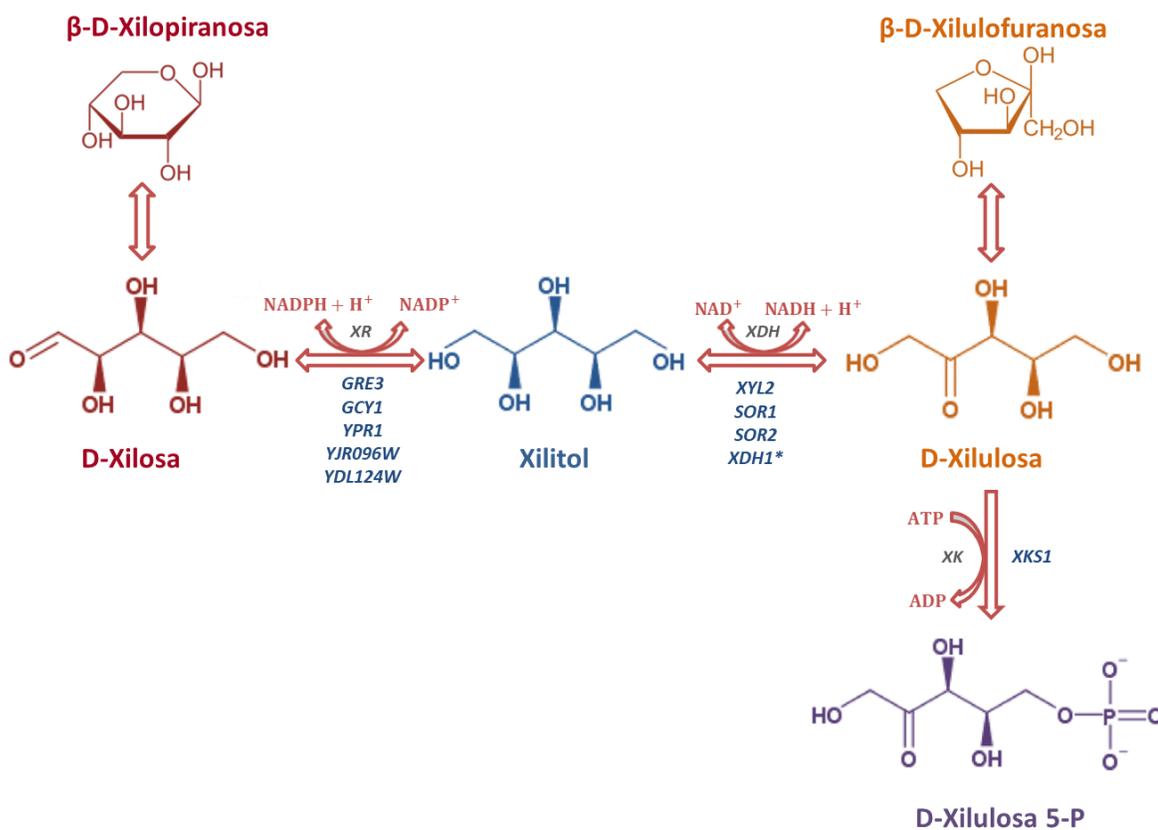


Figura 1-2 – Vía de utilización de D-xilosa en *S. cerevisiae*. La xilosa se reduce primero a xilitol por la enzima xilosa reductasa (XR) usando NADPH, luego el xilitol se oxida a xilulosa por la enzima xilitol deshidrogenasa (XDH) usando NAD⁺, seguido de la fosforilación de xilulosa por la xiluloquinasa (XK) que entrará en la parte no oxidativa de la vía de las pentosas y a la glucólisis, como se muestra en la Figura 1-1. También se muestran los genes putativos presentes en el genoma de *S. cerevisiae* que codifican las tres enzimas. El asterisco indica un gen que se encuentra solo en algunas cepas de levadura de vino. También se muestran las formas cíclicas de las pentosas piranososa y furanososa en solución.

Recientemente, otras publicaciones han reportado que cepas de levadura de *S. cerevisiae* aisladas a partir de jugos de frutas son capaces de consumir algo de xilosa de manera aeróbica (Nasir *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2018). En un estudio de seis cepas industriales para el desarrollo de levaduras recombinantes capaces de fermentar xilosa, una cepa

(YB2625, aislada de bagazo) después de la transformación con una vía de utilización de xilosa mostró un crecimiento más rápido en xilosa y mayores rendimientos de etanol, en comparación con las otras cepas industriales recombinantes (Hector *et al.*, 2011). Esta cepa se mostró capaz de consumir naturalmente algo de xilosa (Cheng *et al.*, 2018). Bajo condiciones de co-fermentación de glucosa/xilosa (80 g/L de glucosa más 20 g/L de xilosa), la cepa no recombinante YB2625 pudo consumir 15,2 g/L de xilosa en 96 horas, mientras que la conocida cepa de laboratorio S288C (la que tuvo su genoma publicado en 1996; ver (Goffeau *et al.*, 1996) consumió solo 7,6 g/L de xilosa en las primeras 10 horas, deteniendo el consumo de la pentosa después de ese tiempo. En estas condiciones, la cepa YB2625 produjo 10,9 g/L de xilitol y la cepa S288C produjo 3,1 g/L, sin diferencias significativas en la concentración de etanol en el medio de fermentación. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la producción de glicerol y ácido acético (mayor con S288C), así como una biomasa ligeramente mayor producida por la cepa YB2625 en todo el cultivo (Cheng *et al.*, 2018).

Otros estudios han demostrado que algunas cepas de *S. cerevisiae* pueden de hecho crecer en xilosa, aunque pobremente. (Attfield y Bell, 2006), utilizando selección natural y reproducción (esporulación sucesiva y *mating*) durante un período prolongado de tiempo en un medio mínimo que contiene xilosa, pudieron obtener una cepa con tasas de crecimiento significativamente mejoradas en esta fuente de carbono. Un análisis de alto rendimiento del crecimiento de 647 cepas de *Saccharomyces* (425 cepas de *S. cerevisiae* de diversas fuentes, incluyendo vino, cerveza, panadería, laboratorio y aislados clínicos, así como 222 levaduras *Saccharomyces sensu stricto* e híbridos) en placas selladas de 96 pozos que contienen xilosa reveló que menos del 7% de las levaduras *S. cerevisiae* (un total de 29 cepas) tuvieron algunos aumentos de la densidad óptica, en comparación con el mismo medio sin fuente de carbono, y estas cepas positivas a xilosa (con modesto crecimiento) fueron predominantemente cepas de vino (Wenger, Schwartz y Sherlock, 2010). El análisis genético (esporulación, cruces con la cepa S288C, y análisis de tétrada) reveló que el fenotipo xilosa positiva es dominante y que un solo gen (locus) era responsable del rasgo en estas cepas de vino.

1.3 Transporte de xilosa por *S. cerevisiae*

Los primeros estudios que tratan de la captación de xilosa por las células de levadura utilizaron este azúcar (en su forma cíclica de D-xilopiranososa; ver Figura 1-2) como un

análogo de glucosa "no metabolizado" para estudiar la especificidad, las propiedades cinéticas y la regulación del sistema de captación de glucosa en *S. cerevisiae* (Alonso y Kotyk, 1978; Cid, Gancedo y Lagunas, 1987; Heredia, Sols y Fuente, 1968; Kotyk, 1967; Kotyk y Kleinzeller, 1963; Lagunas *et al.*, 1982; Leão y van Uden, 1985; Serrano y Delafuente, 1974). Se usó xilosa con el mismo propósito en varias investigaciones relacionadas con el transporte de hexosas por otras especies de levaduras (ej., *K. marxianus*, *S. pombe*). conocidas por ser incapaces de la utilización y/o fermentación de xilosa (Sá-Correia y van Uden, 1983; Hofer y Nassar, 1987). La xilosa también se utilizó para inactivar irreversiblemente las hexoquinasas y glucoquinasas de levadura tanto *in vivo* como *in vitro* (Bergdahl *et al.*, 2013; DelaFuente, 1970; Fernández *et al.*, 1984; Schuddemat, Van den Broek y Van Steveninck, 1986).

Los estudios iniciales de la captación de monosacáridos por *S. cerevisiae* trataron con la especificidad del transporte (Heredia, Sols y Fuente, 1968; Kotyk, 1967), y posteriormente (Serrano y Delafuente, 1974), midiendo la captación inicial de tasas, fueron los primeros en reconocer que la absorción de monosacáridos por *S. cerevisiae* exhibe una cinética compleja, que podría resolverse en dos componentes que representan transportadores de alta y baja afinidad. El componente de baja afinidad fue constitutivo y expresado por células que crecen en medios con alta concentración de glucosa, con un K_m para glucosa, fructosa y manosa de 20 a 70 mM. El componente de alta afinidad fue expresado por células en medios con baja concentración de glucosa, afirmando de alguna manera ser dependiente de hexosa quinasa, reprimida e inactivada por altas concentraciones de glucosa, y capaz de absorber los mismos azúcares mencionados arriba con K_m 's de 1 a 7 mM (Bisson y Fraenkel, 1983; Preez *et al.*, 2000; McClellan y Bisson, 1988; Petit *et al.*, 2000; Postma, Scheffers y van Dijken, 1989; Ramos, Szkutnicka y Cirillo, 1988). Por otro lado, todas las especies de levadura capaces de fermentar xilosa en general tienen actividades de transporte de xilosa de baja y alta afinidad, que cubren un amplio rango de concentraciones de azúcar que se extiende al menos dos o tres órdenes de magnitud, por ejemplo (Does y Bisson, 1989; Kilian, Prior y Preez, 1993; Stambuk *et al.*, 2003). Sin embargo, las afinidades por la xilosa (K_m 0,1 mM – 1,5 M) son más bajas que las encontradas para la glucosa (K_m 10 μ M – 100 mM). Aunque la mayoría de las levaduras presentan tanto el simportador de xilosa- H^+ de alta afinidad como el transporte facilitado de baja afinidad del azúcar, en *S. cerevisiae*, la xilosa se transporta únicamente mediante el transporte facilitado mediado por las permeasas de hexosa. De hecho, todos los transportadores de

baja afinidad de xilosa caracterizados hasta la fecha también transportan glucosa, con mayor afinidad por este azúcar. La glucosa también reprime los sistemas de transporte de alta afinidad, que son permeasas que también comparten ambos azúcares. Como consecuencia, la xilosa siempre se utiliza solo después de que la glucosa se haya agotado significativamente del medio (Bertilsson, Andersson y Lidén, 2008; Hsiao *et al.*, 1982; Panchal *et al.*, 1988; Sánchez *et al.*, 2002; Webb y Lee, 1990; Yablochkova *et al.*, 2003).

El genoma de *S. cerevisiae* contiene una gran familia de 18 genes transportadores de azúcar relacionados (*HXT1* a *HXT17* y *GAL2*) que permiten la fermentación eficiente de glucosa y otras hexosas (Bisson, Fan, y Walker 2016; Boles y Hollenberg 1997; Elbing *et al.*, 2004; Kruckeberg 1996; Lin y Li 2011; Özcan y Johnston 1999; Wieczorke *et al.*, 1999). Estos genes codifican facilitadores de monosacáridos con 12 dominios transmembrana y, en condiciones normales, solo siete transportadores (*HXT1* a *HXT7*) son responsables de la captación de glucosa por *S. cerevisiae*, transportadores que exhiben diferentes afinidades para sustratos (Tabla 1-1), así como diferentes perfiles de expresión durante el crecimiento (Diderich *et al.*, 1999; Reifenger, Boles, y Ciriacy 1997; Reifenger, Freidel, y Ciriacy 1995). En experimentos de captación de ^{14}C - xilosa con células de *S. cerevisiae*, dos componentes de captación cinéticamente distintos con K_m con valores de aproximadamente 100-200 mM (alta afinidad) y 1,5-2,0 M (baja afinidad), lo que indica que el sistema de transporte de hexosas en *S. cerevisiae* tiene una afinidad entre 100 y 200 veces menor por la xilosa que por glucosa (Kötter y Ciriacy 1993; Kotyk 1967; Lagunas *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 2002).

La contribución de los diferentes transportadores de hexosas a la captación de xilosa se ha analizado en una cepa recombinante *hxt-null* que alberga enzimas para el metabolismo de la xilosa, y un informe inicial reveló que solo las transformantes que expresan las permeasas *HXT4*, *HXT5*, *HXT7* y *GAL2* (todas las permeasas *HXT* fueron probadas, excepto *HXT2*) tuvieron crecimiento en esta fuente de carbono (Hamacher *et al.*, 2002). Sin embargo, se publicaron resultados contradictorios con respecto al crecimiento en xilosa de otra cepa recombinante *hxt-null* que alberga la permeasa *HXT1*, que también mostraron evidencia de captación de xilosa por las células *hxt-null* que expresan los transportadores *HXT1*, *HXT2*, *HXT4*, *HXT5*, *HXT7* y *GAL2* (Sedlak y Ho, 2004). Además, células cultivadas con maltosa de la cepa *hxt-null* expresando las diferentes permeasas *HXT* mostró claramente que *HXT1* podía transportar xilosa (Saloheimo *et al.*, 2007), pero con muy baja afinidad (Tabla 1). La falla de las permeasas de baja afinidad *HXT1* y *HXT3* para permitir

el crecimiento o fermentación de xilosa es probablemente una consecuencia de la rápida endocitosis y degradación vacuolar de estos transportadores en la ausencia de glucosa, incluso si otras fuentes de carbono (galactosa, lactato, etanol o xilosa) están presentes en el medio (Hovsepian *et al.*, 2017; Nijland *et al.*, 2016; Roy *et al.*, 2014). De hecho, en una cepa recombinante *hxt-null* la expresión de la permeasa *HXT1* permite el consumo de xilosa durante las co-fermentaciones de xilosa-glucosa (pero no con xilosa sola), previniendo su ubiquitinación (y por lo tanto endocitosis) también permite el crecimiento de las células de levadura en xilosa (Gonçalves, 2014; Nijland *et al.*, 2016). Sin embargo, las cepas recombinantes *hxt-null* con genes para el metabolismo de la xilosa son adecuadas plataformas para la clonación y caracterización de nuevos transportadores de xilosa de otras levaduras fermentadoras de xilosa, por ejemplo (de Sales *et al.*, 2015; Saloheimo *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2011). Las comparaciones de secuencia y el análisis estructural de varios transportadores de azúcar han permitido el desarrollo de permeasas de "hexosas" (mutantes *GAL2* o *HXT7*) con mayor afinidad (o preferencia) por xilosa (Farwick *et al.*, 2014; Young *et al.*, 2014). Sin embargo, su contribución a la utilización de xilosa por cepas *S. cerevisiae* sigue siendo un tema abierto. Por lo tanto, los enfoques para diseñar transportadores de *HXT* para aumentar su afinidad hacia las pentosas, o para evitar su degradación, son estrategias prometedoras para mejorar la producción de bioetanol de segunda generación por levaduras de *S. cerevisiae*.

Tabla 1-1 – Afinidad de los transportadores de hexosas de *S. cerevisiae* por xilosa o glucosa.

Gen transportador	Afinidad aparente [†] (K_m , mM) con:	
	D-glucosa	D-xilosa
<i>HXT1</i>	90 – 130	880
<i>HXT2</i>	1,5 – 4,5	340
<i>HXT3</i>	34 - 65	n.a. [‡]
<i>HXT4</i>	6,2 – 9,4	170
<i>HXT5</i>	6,1 - 10	n.a.
<i>HXT6 / HXT7</i>[§]	0,5 – 2,1	130 - 200
<i>GAL2</i>	1,5 – 1,6	225

[†]Datos obtenidos de (Buziol *et al.*, 2002; Diderich, J. A. *et al.*, 2001; Farwick *et al.*, 2014; Maier *et al.*, 2002; Reifenberger, Boles, y Ciriacy 1997; Saloheimo *et al.*, 2007). [‡]No disponible. [§]Esos dos transportadores son 99% idénticos.

1.4 Ruta metabólica en xilosa de *S. cerevisiae*

En las secciones anteriores hemos demostrado que *S. cerevisiae* fermenta xilulosa (Figura 1-1), puede transportar y consumir algo de xilosa (produciendo principalmente xilitol), y que incluso pocas cepas pueden crecer (modestamente) en esta fuente de carbono, lo que indica la presencia de una vía metabólica de xilosa completa en esta levadura. En otras especies de levaduras que crecen y fermentan xilosa (por ejemplo, *Scheffersomyces stipitis*) esta aldopentosa es primero convertida en la cetopentosa xilulosa mediante dos reacciones secuenciales catalizadas por la xilosa reductasa (*XR*, codificada por *XYL1*) y la enzima xilitol deshidrogenasa (*XDH*, codificada por *XYL2*), seguida por la fosforilación de xilulosa por *XK* (codificado por *XYL3*) para ingresar a la vía no oxidativa de la pentosa-fosfato hacia la glucólisis (Chiang y Knight, 1959; Han *et al.*, 2010; Jeffries *et al.*, 2007; Lee, 1998; Smiley y Bolen, 1982; Yablochkova *et al.*, 2003). En esta vía canónica de reducción-oxidación, la xilosa es primero reducida a xilitol por *XR* usando $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ como donante de protones y electrones, generando NAD(P)^+ , y en un segundo paso el xilitol se oxida a xilulosa por *XDH* usando exclusivamente NAD^+ como protón y aceptor de electrones, que produce $\text{NADH} + \text{H}^+$ (Figura 1-2).

El genoma de la cepa de laboratorio *S. cerevisiae* S288C (Goffeau *et al.*, 1996) tiene cinco genes que codifican enzimas putativas *XR* (*GCY1*, *GRE3*, *YDL124W*, *YJR096W* y *YPR1*), tres genes homólogos para enzimas *XDH* (*SOR1*, *SOR2* y *XYL2*) y *XKS1* que codifica para *XK* (Tabla 1-2). Aunque existe evidencia contradictoria que xilosa puede inducir las actividades *XR* y *XDH*, o incluso de algunos de los genes (*SOR1* y *XYL2*) implicados en el metabolismo de la xilosa, las actividades específicas de estas enzimas son de cinco a diez veces más bajas en *S. cerevisiae* en comparación con otras levaduras fermentadoras de xilosa (Han *et al.*, 2010). Por otra parte, también hay resultados contradictorios con respecto a la capacidad de crecer en xilosa por las células de *S. cerevisiae* que sobreexpresan los genes endógenos de metabolización de xilosa (*GRE3*, *SOR1* o *XYL2*), cuando comparado con células de levaduras que sobreexpresan los genes *XYL1* y *XYL2* para la fermentación de xilosa, que crecieron más rápidamente y acumularon menos xilitol (Batt *et al.*, 1986; Toivari *et al.*, 2004). La acumulación de xilitol en estas cepas recombinantes de *S. cerevisiae* con genes endógenos está causada principalmente por el desequilibrio redox entre la *XR* y enzimas *XDH* que exhiben diferente especificidad por las coenzimas (Tabla 1-2), y otras levaduras fermentadoras de xilosa pueden presentar

actividad *XR* con NADPH y NADH, lo que permite la regeneración de NAD⁺ requerido para la actividad *XDH* (Bruinenberg *et al.*, 1984; Cadete *et al.*, 2016; Hou, 2012).

Tabla 1-2 – Genes que codifican para las enzimas metabólicas de la xilosa en *S. cerevisiae*.

Enzimas y genes:	Descripción: †	Afinidad aparente ‡ (K_m) para:
Xilosa reductasas		
<i>GCY1 (YOR120W)</i>	Glicerol deshidrogenasa, miembro de la familia aldo-ceto reductasa (AKR); inducida por galactosa. <i>GCY1</i> tiene un parálogo, <i>YPR1</i> .	Xilosa = n.m.a.§ NADPH = 0.012 mM¶
<i>GRE3 (YHR104W)</i>	Aldosa reductasa; involucrada en el metabolismo de metilglioxal, D-xylosa, arabinosa y galactosa; estrés inducido y regulado por la vía HOG.	Xylose = 25 mM NADPH = n.a.¶
<i>YDL124W</i>	Alfa-ceto amida reductase dependiente de NADPH; reduce las alfa-cetoamidas aromáticas, los alfa-cetoésteres alifáticos y los alfa-cetoésteres aromáticos; miembro de la familia AKR.	Xilosa = trazas de actividad NADPH = 0.023 mM¶
<i>YJR096W</i>	Xilosa y arabinosa reductasa; miembro de la familia AKR.	Xilosa = 116 mM NADPH = 0.37 mM¶
<i>YPR1 (YDR368W)</i>	Aldo-ceto reductasa dependiente de NADPH; reduce múltiples sustratos que incluyen 2-metilbutiraldehído y D, L-gliceraldehído, la expresión es inducida por estrés osmótico y oxidativo; <i>YPR1</i> tiene un parámetro, <i>GCY1</i> .	Xilosa = 37 mM NADPH = n.a.
Xilitol deshidrogenasas		
<i>SOR1 (YJR159W)</i>	Sorbitol deshidrogenasa, la proteína es 99% idéntica a Sor2p, la expresión es inducida en la presencia de sorbitol o xilosa.	Xilitol = n.a. NAD ⁺ = n.a.
<i>SOR2 (YDL246C)</i>	Sorbitol deshidrogenasa.	Xilitol = n.a. NAD ⁺ = n.a.
<i>XDH1</i>	Xilitol deshidrogenasa; involucrado en la utilización de xilosa como fuente de carbono, no presente en S288C, pero ubicado en una inserción de 65 kb en el brazo derecho del cromosoma XV en muchas cepas de vino como EC1118 y AWRI1631	Xilitol = n.a. NAD ⁺ = n.a.
<i>XYL2 (YLR070C)</i>	Xilitol deshidrogenasa, convierte xilitol en D-xilulosa, expresión inducida por xilosa, mutante nulo tiene defecto en la pared celular.	Xilitol = 25 mM NAD ⁺ = 100 µM Xilulosa = 1.1 mM NADH = 240 µM
Xiluloquinasa		
<i>XKS1 (YGR194C)</i>	Xiluloquinasa; convierte D-xilulosa y ATP en xilulosa 5-fosfato y ADP; paso de limitación de velocidad en la fermentación de xilulosa; requerido para la fermentación de xilosa por cepas recombinantes de <i>S. cerevisiae</i>	Xilulosa = 310 µM ATP = 1.55 mM

†Obtenido de la base de datos Saccharomyces Genome Database (Cherry *et al.* 2012). ‡Datos obtenidos from Chang *et al.* (2007), Garay-Arroyo & Covarrubias (1999), Petrash *et al.* (2001), Richard *et al.* (1999), Richard *et al.* (2000), Rodríguez-Peña *et al.* (1998), Sarthy *et al.* (1994), Träff *et al.* (2002), Wenger *et al.* (2010). §Sin medida de actividad. ¶Determinado con otros sustratos de aldehído, no xilosa. ¶No disponible.

Como se mencionó anteriormente, algunas cepas de vino pueden crecer modestamente sobre xilosa, y el análisis genético reveló que el fenotipo xilosa positiva está vinculado a un locus único y dominante (Wenger, Schwartz y Sherlock, 2010). Estos autores utilizaron

análisis segregante (*bulk segregant analysis*) y matrices de mosaico de levadura en un cruce entre una cepa de vino xilosa positiva y la cepa de laboratorio xilosa negativa S288C, y sus resultados señalaron una región en el brazo subtelomérico derecho del cromosoma XV como responsable para el locus dominante. Posteriormente, aplicaron análisis segregantes a granel y secuenciación de próxima generación de alto rendimiento en tres grupos de segregantes xilosa positivos derivados de tres cruces diferentes, y por ensamblaje *de novo* de las lecturas que no se asignaron al genoma de referencia S288C, pudieron identificar un nuevo gen homólogo *XDH* a *SOR1* (denominado *XDH1*; Tabla 1-2) en una región subtelomérica de 65 kb del cromosoma XV presente en varias cepas de vino, una región que pudo transferirse horizontalmente de una levadura no *Saccharomyces* (Borneman *et al.*, 2012; Novo *et al.*, 2009). Esta región es probablemente derivada de la levadura *Torulaspota microellipsoides* y contiene varios genes implicados en las funciones clave de la fermentación del vino, incluido un transportador por simporte de alta afinidad de fructosa-H⁺ codificado por el gen *FSY1*, así como dos genes duplicados en tándem *FOT1* y *FOT2* que codifican para transportadores de oligopéptidos, así como otro homólogo de *SOR2* (Coelho *et al.*, 2013; Marsit *et al.*, 2015).

Los autores confirmaron que el gen *XDH1* era el responsable del crecimiento en xilosa al eliminar el gen de una cepa de vino (que pierde la capacidad de crecer en esta fuente de carbono) y mediante la clonación del gen de una cepa de vino (incluidas las secuencias aguas arriba y aguas abajo) en un plásmido, que confería crecimiento a la xilosa cuando se transformaba en la cepa S288C.

Además, realizaron un análisis exhaustivo de la participación de todos los demás genes enumerados en la Tabla 1-2 en el fenotipo xilosa positiva de una cepa de vino, mediante el silenciamiento de cada gen y todas las combinaciones posibles de varios de los genes involucrados, y confirmaron que *XDH1*, *XKS1* y dos genes *XR* (*GRE3* y *YPR1*) son necesarios para el crecimiento utilizando xilosa como fuente de carbono. Por otro lado, cuando fueron eliminados cualquiera de los tres genes *XDH* (*sor1Δ*, *sor2Δ* o *xyI2Δ*), el fenotipo de crecimiento en xilosa mejoró, e incluso mejoró aún más cuando los tres genes fueron silenciados totalmente, indicando que las enzimas xilitol deshidrogenasas putativas presentes en el genoma de *S. cerevisiae* en realidad pueden inhibir la utilización de xilosa por cepas no recombinantes (Wenger, Schwartz y Sherlock, 2010). Además de toda esta información genética sobre la importancia del gen *XDH1* para el crecimiento de cepas de

vino en xilosa, desafortunadamente no hay información sobre las propiedades bioquímicas (incluidas las afinidades por los sustratos) de la enzima *XDH* codificada por *XDH1*.

1.5 Análisis transcriptómico de cepas *S. cerevisiae* no recombinantes que usan xilosa

Para comprender mejor la capacidad natural de algunas cepas de *S. cerevisiae* para consumir/crecer en xilosa, se han reportado dos publicaciones de análisis transcriptómico comparativo de cepas de levadura no recombinantes durante el consumo de xilosa (Cheng *et al.*, 2018; Wenger, Schwartz y Sherlock, 2010).

Cheng y colaboradores (2018) utilizaron la cepa no recombinante YB-2625 en condiciones de co-fermentación de glucosa/xilosa y compararon esta cepa con la cepa de laboratorio S288C en dos condiciones: fase de utilización de xilosa para ambas cepas (primeras 7 horas de fermentación), y después de 48 horas cuando solo la cepa YB-2625 continuó consumiendo xilosa. Los resultados de ARN-seq mostraron que 1.637 genes se expresaron diferencialmente (1.313 *down-regulated* y 324 *up-regulated*) en la cepa de levadura no recombinante a las 7 horas de fermentación, y 2.004 genes (1.727 *down-regulated* y 277 *up-regulated*) fueron diferencialmente expresados en la cepa YB-2625 durante la etapa de utilización de xilosa. El análisis de términos de ontología genética (GO) reveló cambios significativos en los genes enriquecidos en el ciclo celular, el metabolismo de los nucleótidos, la síntesis y replicación del ADN y el metabolismo de las vitaminas y los cofactores en ambas etapas. La cepa YB-2625 también mostró una expresión enriquecida de genes involucrados en la fermentación del alcohol, la biosíntesis de ribosomas y la traducción durante la fermentación de azúcares mixtos, lo que indica que la síntesis de proteínas fue más activa en YB-2625 que en S288C.

Durante la utilización de xilosa, los genes expresados diferencialmente en la cepa YB-2625 estuvieron involucrados en la modificación/respuesta de daño del ADN, metabolismo de lípidos, fosfatos y azufre, así como en la desintoxicación, en el peroxisoma y homeostasis, indicando que la respuesta al estrés fue más evidente durante el consumo de xilosa. Por otro lado, varios factores de transcripción relacionados con la respuesta al estrés fueron enriquecidos, pero *MSN4* fue *down-regulated* en YB-2625 (en comparación con S288C) en ambas etapas, lo que concuerda con los resultados que indican que la

eliminación de *MSN4* mejora la fermentación de xilosa durante las fermentaciones de azúcares mixtos por cepas recombinantes de *S. cerevisiae* (Michael *et al.*, 2016).

Con respecto a los transportadores de hexosa, *HXT3*, *HXT4* y *HXT7* (Tabla 1-1) fueron *up-regulated* en la cepa YB-2625 durante la utilización de xilosa, y los transportadores codificados por *HXT5* y *HXT13* se expresaron más en ambas etapas, en comparación con la cepa S288C. Es importante notar que los genes homólogos para *HXT13* también están presentes en el fragmento de ADN de 65 a 80 kb ubicado en el subtelómero derecho del cromosoma XV de cepas de vino capaces de crecer en xilosa, donde *XDH1* y otro homólogo de *SOR2* son encontrados (Borneman *et al.*, 2012; Coelho *et al.*, 2013; Marsit *et al.*, 2015; Novo *et al.*, 2009). *HXT13* ha sido recientemente descrito (con *HXT15*, *HXT16* y *HXT17*) como transportadores de polirol permitiendo la utilización de manitol y sorbitol por la levadura (Jordan *et al.*, 2016). Este estudio también reveló como transportadores de xilitol *HXT11* y *HXT15*.

Con respecto a los genes putativos de la vía de utilización de la xilosa, en la cepa YB-2625 fueron inducidos los genes que codifican para la enzima xilosa reductasa (*XR*) *GCY1*, *GRE3* y *YPR1* durante la fermentación de azúcares mixtos y durante el consumo de xilosa solo *YPR1* fue *up-regulated*. El gen que codifica para la enzima xilitol deshidrogenasa (*XDH*) *XYL2* fue levemente inducido en YB-2625 durante ambas etapas (sin expresión significativa de *SOR1* o detección de *SOR2*), y *XKS1* y *TKL2* también fueron significativamente inducidos en ambas etapas. Todos estos perfiles de expresión indican que los genes *XDH* endógenos son un cuello de botella para que la levadura natural metabolice xilosa. Los datos disponibles también sugieren que la cepa YB-2625 muestra una menor represión de glucosa, mayor expresión de genes sensibles a estrés oxidativo, así como de genes implicados en la gluconeogénesis, ciclo de TCA y biosíntesis de ergosterol (Cheng *et al.*, 2018).

Wenger y colaboradores (2010) también realizaron un análisis de transcriptoma utilizando *microarrays* de las cepas de vino que pueden crecer modestamente sobre xilosa, comparando con los datos obtenidos con cepas que carecen del gen *XDH1*, y también en presencia/ausencia de xilosa en el medio de crecimiento. Un total de 1.266 genes mostraron diferencias de expresión a lo largo del tiempo entre las cepas positivas y negativas, y a la presencia o ausencia de xilosa. Con respecto a los genes de la vía de utilización de la xilosa, los datos del *microarray* mostraron que los genes *XR* *GCY1*, *GRE3* y *YPR1* fueron *up-regulated* solo en presencia del gen *XDH1*, y durante incubación en

xilosa, lo mismo ocurre con el gen *XDH XYL2*, y los genes *SOR1* y *SOR2* también fueron *up-regulated* solo en cepas xilosa positivas, tanto en presencia como en ausencia de xilosa. Por otro lado, no se observó diferencia en el nivel de expresión de *XKS1* entre las cepas y las condiciones de crecimiento. La agrupación de la expresión de patrones y el análisis de término GO de cada grupo reveló que los genes involucrados en la traducción, la biogénesis de los ribosomas, el transporte mediado por vesículas y la localización celular (entre otros procesos relacionados) fueron *up-regulated* durante el crecimiento en xilosa por las cepas que tienen la deshidrogenasa *XDH1*, lo que confirma que las células de levadura estaban creciendo. Otros genes *up-regulated* durante el crecimiento en xilosa fueron enriquecidos para el proceso metabólico de pentosas y respuesta al estrés oxidativo, como también lo demostraron Cheng y colaboradores (2018). También fue observado que algún conjunto de genes inducidos por el consumo de xilosa o el crecimiento en xilosa están *up-regulated* durante la fermentación de xilulosa (Mittelman y Barkai, 2017; Tamari *et al.*, 2014).

Aunque las cepas de *S. cerevisiae* tienen todos los genes necesarios para la utilización y fermentación de xilosa, la expresión de los transportadores y enzimas requeridas es extremadamente baja, especialmente en la presencia de xilosa, lo que indica que esta levadura no tiene un sistema de detección y señalización para la utilización de esta fuente de carbono.

De esta manera, en general, las cepas de levadura genéticamente modificadas se transforman con los genes requeridos bajo el control de promotores fuertes y constitutivos para asegurar la expresión adecuada de las enzimas/transportadores, los cuales en general no son totalmente apropiados para el fenotipo deseado. Este problema se ha abordado recientemente por (Endalur Gopinarayanan y Nair, 2018) utilizando el sistema regulador de galactosa en *S. cerevisiae*. Para la utilización eficiente de la galactosa, el sensor/regulador *GAL3*, que en presencia de galactosa y ATP se une a *GAL80*, disminuye la inhibición de *GAL4* (un activador transcripcional de la familia de grupos de zinc – *zinc cluster family*) por *GAL80*, lo que permite la inducción de todos los genes *GAL* de la vía de Leloir, y varios otros genes requeridos para el crecimiento/fermentación, pero no directamente involucrados en la asimilación de galactosa (Malakar y Venkatesh, 2014; Peng y Hopper, 2002). Los autores demostraron que en una cepa *gal4Δ* (con el gen *GAL4* silenciado) la expresión constitutiva (a través de promotores fuertes) de las enzimas intracelulares necesarias para la utilización de galactosa (codificadas por *GAL1*, *GAL7* y

GAL10), produce una cepa de levadura que crece poco en esta fuente de carbono, como también observado en la utilización de xilosa por cepas de levadura recombinantes actuales. Además, muestran la importancia de los sistemas reguladores mediante la selección de una biblioteca de reguladores *GAL3* mutantes que pueden reconocer la xilosa y analizar el impacto de este "nuevo" sistema regulador en la utilización de xilosa por células de levadura. No es sorprendente que cuando los genes necesarios para la utilización de xilosa (xilosa isomerasa codificada por *XYLA*, la permeasa *GAL2* y *XKS1* y *TAL1*) se colocaron bajo el control de los promotores *GAL1* y *GAL10* en las células *GAL4*, la cepa que alberga el regulador *GAL3* mutado (que reconoce la xilosa) creció más rápido y consumió toda la xilosa en el medio, y una cepa con expresión constitutiva de estos genes creció a tasas específicas más bajas y no pudo consumir completamente la xilosa (Endalur Gopinarayanan y Nair, 2018). Para comprender mejor los efectos del regulón sintético de xilosa, se realizó un análisis transcriptómico utilizando RNA-seq, que reveló más de 3.314 genes expresados diferencialmente al comparar las células xilosa - "regulada" con la cepa constitutiva de xilosa durante el crecimiento en xilosa. Una comparación con cepas galactosa-regulada y galactosa-constitutiva durante el crecimiento en galactosa reveló que las cepas reguladas tenían en común 452 genes *up-regulated* y 507 *down-regulated*. El análisis de término GO reveló que las cepas reguladas tenían genes *up-regulated* asociados con 36 términos GO, incluida la traducción mitocondrial y transporte, división celular, producción de ATP, importación de proteínas, entre otros.

En el caso de genes *down-regulated*, se encontraron 11 términos GO involucrados en procesos como el metabolismo de ácidos grasos y lípidos, reparación de ADN y respuesta al estímulo (particularmente la respuesta al estrés). En efecto, en las cepas constitutivas, un total de 27 factores transcripcionales involucrados en respuesta al estrés, la falta de nutrientes y el estrés en la replicación del ADN fueron *up-regulated*, lo que indica que las cepas constitutivas exhiben una respuesta similar al estrés y a la inanición cuando se cultivan en fuentes de carbono para las cuales los sistemas de detección de nutrientes están ausentes (Endalur Gopinarayanan y Nair, 2018).

Se ha demostrado que la xilosa promueve la represión de algunos de los genes reprimidos por glucosa (Belinchón y Gancedo, 2003). Sin embargo, esto probablemente no sea la consecuencia de la interacción de esta pentosa con hexoquinasa II (codificada por *HXK2*), un componente conocido de la vía de señalización de represión/desrepresión de glucosa, porque xilosa promueve una conformación *HXK2* similar a la observada en condiciones de

baja glucosa (Moreno, Vega y Herrero, 2016; Shoham y Steitz, 1982). Otras publicaciones han demostrado que *S. cerevisiae* carece de una respuesta de señalización para la xilosa extracelular, pero la xilosa intracelular ejerce un efecto parcial desrepresivo, diferente a la falta de glucosa (Brink *et al.*, 2016). Cuando se analizaron células de levaduras recombinantes capaces de asimilar la xilosa, los resultados indicaron que la xilosa intracelular desencadena una señal similar a la falta de carbono en las células que metabolizan activamente la xilosa, probablemente causando las bajas tasas de asimilación observadas con esta fuente de carbono (Osiro *et al.*, 2018). Por tanto, los mecanismos por los cuales la xilosa desencadena una respuesta de señalización en *S. cerevisiae* aún no están claros, y se requieren análisis con evidencia que indiquen la necesidad de redefinir las rutas de los factores de transcripción, rutas señaladoras, y proteínas estructurales y regulares para alcanzar la asimilación eficiente de pentosas en *S. cerevisiae* (Endalur Gopinarayanan y Nair, 2019).

1.6 Mejoramiento de la utilización de xilosa por cepas *S. cerevisiae*

Como se señaló anteriormente, la composición de los medios puede tener un impacto significativo sobre el consumo de xilosa por cepas de levadura no recombinantes. Utilizando la metodología de superficie de respuesta y la optimización estadística de las variables de entrada, Sharma y colaboradores (2018) pudieron mejorar la utilización de xilosa en co-fermentaciones de glucosa/xilosa en una cepa de levadura LN natural ITCC 8246, que en un trabajo anterior mostró buen crecimiento en hidrolizados de paja de arroz, produciendo etanol (Arora *et al.*, 2016). Se demostró que esta cepa consume 3,7 g/L de xilosa (a partir de una concentración inicial de 20 g/L) en 72 h, produciendo 1,1 g/L de etanol (un $Y_{e/x}$ de 0,30 g de etanol/g de xilosa, con una eficiencia de fermentación del 58%). Durante las co-fermentaciones de glucosa/xilosa, la adición de pequeñas cantidades de peptona (0,25%) y extracto de levadura (0,36%) permitió la utilización del 33% de la xilosa presente en el medio, aumentando las concentraciones de etanol. Aunque la actividad específica de las enzimas *XR* y *XDH* fue muy baja después del crecimiento sobre xilosa al 2%, se observaron actividades más altas después del crecimiento sobre glucosa al 2% más xilosa al 2%.

Otro enfoque que se puede tomar para mejorar la vía nativa de utilización de xilosa por *S. cerevisiae*, en el contexto de la autoclonación, utiliza promotores endógenos para

sobreexpresar los genes *XR*, *XDH* y *XK* presentes en el genoma de esta levadura. Un informe reciente que compara la sobreexpresión del gen *XYL1* de *S. stipitis* con el gen *GRE3* de *S. cerevisiae*, así como la sobreexpresión del gen *XYL2* de *S. stipitis* con los genes *SOR1/XYL2* de *S. cerevisiae*, mostró que las enzimas de *S. cerevisiae* tenían actividades similares (*SOR1*) o incluso más altas (*GRE3*) que sus contrapartes de *S. stipitis* (Konishi *et al.*, 2015). Por otra parte, una cepa de levadura industrial (la levadura de sake Kyokai No. 7) que sobreexpresa la *XKS1* endógena de *S. cerevisiae* y los genes *GRE3* y *SOR1* (todos integrados en el genoma), se desempeñó mejor durante la co-fermentación de mezclas de glucosa/xilosa, que la misma cepa industrial que sobreexpresa los genes heterólogos *XYL1* y *XYL2* de *S. stipitis*, una modificación genética clásica para promover la fermentación de xilosa por *S. cerevisiae*. Sin embargo, durante la fermentación de xilosa pura (50 g/L), la cepa industrial sobreexpresando los genes *XYL1* y *XYL2* de *S. stipitis* funcionó mejor, que la misma cepa que sobreexpresa *GRE3* y *SOR1* de *S. cerevisiae* (que produjo menos etanol y mayores cantidades de xilitol y glicerol). Debido a que el suministro de NAD^+ para *XDH* es crítico, la reductasa *XYL1* de *S. stipitis* parece ser más adecuada para la fermentación de xilosa ya que esta enzima utiliza tanto NADPH como NADH (y *GRE3* es estrictamente NADPH -dependiente) para reducir la xilosa y, por lo tanto, el desequilibrio del cofactor en la vía *XR-XDH* debe superarse mediante la optimización del suministro de oxígeno (Konishi *et al.*, 2015).

Para mejorar aún más el rendimiento de la levadura autoclonada, los autores sobreexpresaron los genes endógenos *GRE3*, *SOR1*, *XYL2* y *XKS1* en la levadura de sake industrial Kyokai No. 7 y realizaron un modelo de simulación cinética de la producción de etanol con análisis sensible para revelar las reacciones metabólicas de cuello de botella en la fermentación de xilosa. Ya se conocían dos de las estrategias de manipulación mejor clasificadas: la actividad de *XDH* y la captación de xilosa. Debido a que las enzimas *XDH* ya estaban sobreexpresadas, y dada la complejidad de transporte de azúcar en *S. cerevisiae* (Tabla 1-1), los autores decidieron buscar en la tercera reacción enzimática clasificada (alcohol deshidrogenasa, codificada por *ADH1*) la cual podría tener un impacto en la producción de etanol, porque su simulación indicó que un aumento doble de su actividad aumentaría la productividad del etanol en un ~ 13% (Fukuda *et al.*, 2018). La cepa industrial que sobreexpresa la vía endógena *XR-XDH* sobreexpresando *ADH1* produjo un 10% más de etanol (y menos xilitol) a partir de 50 g/L de xilosa ($Y_{e/x}$ de 0,27 g de etanol/g de xilosa), en comparación con la cepa isogénica que no sobreexpresa *ADH1* ($Y_{e/x}$ de 0,25 g de etanol/g de xilosa). Sin embargo, durante co-fermentaciones glucosa/

xilosa, la sobreexpresión de *ADH1* no aumentó el rendimiento de etanol, a menos que se controlara el oxígeno disuelto en el medio. Cuando se mantiene a 0,2 ppm, fue observado un aumento del 9,5% en la producción de etanol en la cepa que sobreexpresa *ADH1*, alcanzando el 73,3% del rendimiento máximo de etanol ($Y_{e/s}$ de 0,38 g de etanol/g de azúcar total), lo que indica que las células de *S. cerevisiae* autoclonadas para el uso de xilosa pueden alcanzar rendimientos de etanol cercanos a los informados para las cepas de levadura OGM que expresan genes heterólogos.

Basado en los datos del transcriptoma de la cepa natural YB-2625 capaz de consumir xilosa, la cual mostró una mayor expresión de genes sensibles al estrés oxidativo, Cheng y colaboradores (2018) fueron capaces de mejorar en un 13-18% el consumo de xilosa mediante una cepa recombinante de levadura (isogénica para YB-2625) que sobreexpresa la catalasa citosólica codificada por *CTT1* o la peroxidasa mitocondrial codificada por *PRX1*. Desafortunadamente, estos autores no evaluaron si esas sobreexpresiones aumentarían el consumo de xilosa por la cepa nativa YB-2625. De hecho, existen varias publicaciones que muestran varias modificaciones genéticas (deleciones o sobreexpresiones) en cepas recombinantes fermentadoras de xilosa que mejoran el consumo de xilosa y/o fermentación (Bengtsson *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2018; Michael *et al.*, 2016; Nijland *et al.*, 2017; Parachin *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2018), y sería interesante ver si esas intervenciones mejorarían la fermentación de xilosa por cepas de *S. cerevisiae* consumidoras naturales de xilosa o autoclonación. Por ejemplo, un objetivo interesante es el gen *PHO13* de *S. cerevisiae*, un gen que codifica una fosfatasa alcalina conocida por suprimir la utilización de xilosa por cepas recombinantes de levadura (Bamba, Hasunuma y Kondo, 2016; Kim *et al.*, 2013; Ni, Laplaza y Jeffries, 2007; Van Vleet, Jeffries, y Olsson 2008). En efecto, se ha reportado que la delección de *PHO13* conduce a una *up-regulation* de los genes pentosa fosfato, incluido *TAL1* (que codifica transaldolasa) y *TKL1* (que codifica la transcetolasa), una *up-regulation* mediada por el factor de transcripción de clúster zinc *STB5* responsable de la regulación de la vía de las pentosas fosfato (Larochelle *et al.*, 2006), mejorando la fermentación de xilosa por células *S. cerevisiae* recombinantes (Kim *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016). Se espera que muchas de estas modificaciones podrían mejorar la utilización de xilosa por cepas *S. cerevisiae* con una vía nativa de xilosa, y siendo optimistas veremos los resultados de tales esfuerzos en un futuro próximo. Desafortunadamente no hay datos de la secuencia del genoma de cepas naturales capaces de consumir o crecer en xilosa,

aunque hay afirmaciones (pero no hay datos públicos disponibles) de al menos dos cepas secuenciadas (Cheng *et al.*, 2018; Cifuentes *et al.*, 2015). Otros enfoques que podrían ser utilizados para mejorar la utilización de xilosa por cepas *S. cerevisiae* autoclonadas o no recombinantes son mutagénesis aleatoria (p. Ej., (Kahar, Taku y Tanaka, 2011; Ni, Laplaza y Jeffries, 2007; Wahlbom *et al.*, 2003), o incluso ingeniería evolutiva colocando las células en cultivo continuo bajo presión selectiva utilizando xilosa como fuente primaria de carbono, como ya se ha realizado con cepas recombinantes de levadura que expresan vías heterólogas *XR/XDH* (Garcia Sanchez *et al.*, 2010; Novy *et al.*, 2017; Scalcinati *et al.*, 2012; Sonderegger y Sauer, 2003; Zha *et al.*, 2014). Por ejemplo, *up-regulation* de los genes de biosíntesis de vitamina B1 y B6 indicaron que la tiamina servía como un cofactor importante en el metabolismo de la xilosa (Zeng *et al.*, 2017), una característica compartida con cepas de levadura industriales robustas utilizadas para la producción eficiente de bioetanol (Della-Bianca *et al.*, 2013; McIlwain *et al.*, 2016; Stambuk *et al.*, 2009).

1.7 Conclusiones

Todos los datos disponibles obtenidos durante décadas de estudios sobre la fermentación de xilosa por levaduras han revelado que la diversidad genética natural de *S. cerevisiae* incluye cepas capaces de consumir parte de la xilosa presente en el medio o incluso cepas que crecen (modestamente) en esta fuente de carbono. Todos los transportadores y enzimas requeridos para la utilización de xilosa están presentes en el genoma de esta levadura, pero su cinética y/o expresión es demasiado baja para asegurar una fermentación de xilosa eficiente. Los enfoques de autoclonación para sobreexpresar las enzimas (y transportadores) necesarios son estrategias prometedoras para desarrollar cepas de levadura de *S. cerevisiae* fermentadoras de xilosa no transgénicas, y se esperan más mejoras a partir del conocimiento ya adquirido con el desarrollo de *S. cerevisiae* recombinantes con genes heterólogos para la vía *XR/XDH/XK*, incluyendo mutagénesis e ingeniería evolutiva.

2. Perfil fenotípico en xilosa de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* 202-3

Se ha planteado como dogma científico que *S. cerevisiae* no puede metabolizar xilosa como única fuente de carbono (Hou *et al.*, 2017; Zha *et al.*, 2014; Matsushika *et al.*, 2009; Hanly y Henson, 2013; Hahn-Hägerdal *et al.*, 1991). Sin embargo, existen reportes que han mostrado que algunas aislados naturales de *S. cerevisiae* han sido capaces de crecer en este azúcar (Attfeld y Bell, 2006; Wenger, Schwartz y Sherlock, 2010; Patiño *et al.*, 2019) aunque de forma modesta.

Otros estudios reportan que algunas cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* han presentado metabolización de xilosa, pero la mayoría se refieren a cepas modificadas genéticamente, con eficiencia y velocidades de fermentación de xilosa relativamente bajas (Gonçalves *et al.*, 2014; Matsushika *et al.*, 2009; Matsushika, Goshima y Hoshino, 2014; Matsushika, Watanabe, Kodaki, Makino, Inoue, *et al.*, 2008; Turner *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2013).

La cepa 202-3, microorganismo de estudio en este proyecto de investigación, es una cepa de levadura que muestra una capacidad innata de metabolizar xilosa, con la atractiva característica de pertenecer al género y la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Esta cepa fue aislada en 2010 por el Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos de la Universidad Nacional de Colombia, a partir de mieles de caña de azúcar obtenidas de un tanque de almacenamiento de seis meses en el municipio de Puerto López, departamento del Meta, Colombia (Velásquez y Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos 2015).

En este capítulo se muestran las metodologías y resultados para el cumplimiento del objetivo específico que consiste en establecer el perfil fenotípico en consumo de xilosa de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* 202-3. Se confirmó la especie de la cepa 202-3, se

analizó su capacidad de producir biomasa usando como única fuente de carbono xilosa, se analizó su ploidía y la presencia de los genes involucrados en la metabolización de xilosa. En las diferentes condiciones analizadas se muestra que la cepa 202-3 crece, consume xilosa y produce xilitol.

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Microorganismos

En este trabajo fueron empleadas levaduras y bacterias. La cepa de estudio 202-3 se encuentra depositada en el Banco de Cepas y Genes del Instituto de Biotecnología con el código IBUN 090-03602 bajo la certificación IB-159-17. Las levaduras CEN.PK2-1C (*MAT α leu2-3,112 ura3-52 trp1-289his3 Δ 1 MAL2-8^C SUC2*), CEN.PK2-1D (*MAT α leu2-3,112 ura3-52 trp1-289his3 Δ 1 MAL2-8^C SUC2*), CEN.PK2 (*MAT α leu2-3,112 ura3-52 trp1-289his3D1 MAL2-8^C SUC2* / *MAT α leu2-3,112 ura3-52 trp1-289his3D1 MAL2-8^C SUC2*), *Scheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*), *Candida tropicalis* 116-3, *Candida tropicalis* 116-5, *S. cerevisiae* Q1, Ethanol Red y Lalvin EC 1118[®] fueron usadas como control en algunos de los ensayos. Los microorganismos fueron conservados usando glicerol como criopreservante a una concentración de 25 % y almacenados en ultracongelador a -70 °C.

2.1.2 Medio de cultivo

Para el crecimiento de las levaduras analizadas fueron utilizados el medio sintético *Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids* (Y0626-SIGMA-ALDRICH) también conocido como YNB, el medio rico completo YP, medio completamente definido (Verduyn *et al.*, 1992) y el medio *Chloramphenicol Glucose Agar* – CGA.

El medio sintético YNB fue enriquecido con diferentes concentraciones de los azúcares a analizar. Este medio contiene vitaminas esenciales, elementos traza y sales inorgánicas necesarias para el crecimiento de levaduras, pero no contiene aminoácidos.

El medio rico completo contiene 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona bacteriológica y fue enriquecido con el azúcar de interés en las concentraciones a analizar. El pH fue ajustado a 6,0 con ácido clorhídrico (HCl) 1 M. Se denominó medio YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) cuando fue enriquecido con glucosa, YPX cuando fue enriquecido con xilosa, YPXD cuando fue enriquecido con xilosa y glucosa. El extracto de

levadura contiene los aminoácidos necesarios para el crecimiento de las cepas y la peptona es utilizada como fuente de nitrógeno.

El medio completamente definido (Verduyn *et al.*, 1992) está constituido por sulfato de potasio K_2SO_4 6,6 g/L; fosfato de potasio K_2PO_4 3,0 g/L; sulfato de magnesio $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g/L; urea 2,3 g/L; solución de elementos traza 1 mL/L; solución de vitaminas 1 mL/L y se enriqueció con el azúcar de interés en la concentración analizada. El pH fue ajustado a 6,0. El azúcar, la urea, elementos traza y las vitaminas se adicionaron después del proceso de esterilización.

El medio *Chloramphenicol Glucose Agar* es un medio que favorece el crecimiento de levaduras e inhibe el crecimiento de bacterias. Este medio fue empleado para crecer algunas de las levaduras usadas en este estudio.

Los medios fueron esterilizados a 121 °C, 103 kPa (15 lbf/in²) de presión, durante 15 minutos. Cuando la fuente de carbono fue xilosa, esta se esterilizaba por separado del medio para evitar su caramelización. En la preparación de los medios sólidos, se adicionó agar 20 g/L al medio a ser utilizado.

2.1.3 Microscopía óptica y de barrido

Las cepas de levadura fueron crecidas en medio líquido YPD (2% de glucosa), YPX (2% de xilosa) y YPXD (2% de glucosa+2% de xilosa). Se tomaron alícuotas de los diferentes medios a diferentes tiempos de crecimiento, se prepararon las láminas de observación en fresco y se realizó la observación en el microscopio Olympus BX41, iniciando en el objetivo de aumento 10X hasta el objetivo 100X.

Para la observación de la cepa 202-3 y de otras cepas control en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), las levaduras fueron crecidas previamente en tubos de plástico de 50 mL de capacidad y 20 mL de medio.

Por cada cepa de levadura se realizaron 3 muestras separadas. Las muestras fueron centrifugadas durante 15 min a 6000 rpm. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* de levaduras fue congelado durante la noche a -20 °C. Al día siguiente fueron transferidos los tubos con los *pellets* congelados a -70 °C. Posteriormente, se hizo el montaje de las muestras en el liofilizador Labconco™ FreeZone™ y se liofilizó por 8 horas. El recubrimiento de las muestras con oro se realizó en el equipo Quorum Q150R ES.

2.1.4 Extracción de ADN genómico de levaduras

Para la extracción del ADN genómico de levaduras fueron utilizados los protocolos descritos por (Harju, Fedosyuk y Peterson, 2004; Lööke, Kristjuhan y Kristjuhan, 2011; Maqueda *et al.*, 2010) y el kit comercial *YeaStar™ Genomic DNA Kit* (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante (ver Anexo E).

2.1.5 Reacción en cadena de la polimerasa PCR

Los iniciadores (*primers*) para la amplificación de los fragmentos de interés fueron contruidos según (Ye *et al.*, 2012) con el software on-line Iniciador-BLAST de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/Iniciadorblast>) teniendo como base la secuencia genómica de la levadura *S. cerevisiae* encontrada en la base de datos SGD (*Sacharomyces Genome Database* en www.yeastgenome.org).

Para la amplificación del fragmento deseado fue usada la enzima de alta fidelidad Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs). Las reacciones se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.1.6 Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos de ADN fueron analizados por electroforesis en gel de 1 % de agarosa usando como solución amortiguadora TBE 0,5 X (1 mM de EDTA en buffer 45 mM Tris-borato pH 8,0). La tinción del gel de agarosa se realizó con HydraGreen™ Safe DNA Dye de ACTGene. El voltaje aplicado al gel fue de 90 mV. Los geles fueron observados en un fotodocumentador.

2.1.7 Identificación de especie usando iniciadores específicos

Para la determinación de especie se realizó la amplificación de un fragmento de 150 pb por PCR usando los iniciadores ScerF2 (5'-GCGCTTTACATTCAGATCCCGAG-3') y ScerR2 (5'-TAAGTTGGTTGTCAGCAAGATTG-3') descritos para la diferenciación de la especie *S. cerevisiae* (Muir, Harrison y Wheals, 2011).

2.1.8 Confirmación de especie por secuenciación de las regiones ITS

La secuenciación de las regiones ITS (*Intergenic Transcribed Spacer*) por extensión del iniciador de la cepa 202-3 se realizó con el objetivo de confirmar que perteneciera a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Para esto fueron realizadas extracciones de ADN genómico de las levaduras (cepa de interés y cepas control). Posteriormente se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar las secuencias ITS en cada una de las levaduras.

Para la realización de la PCR se tomaron en cuenta las recomendaciones del fabricante de la enzima de alta fidelidad utilizada (Tabla 2-1).

Tabla 2-1 – Condiciones de PCR para obtener los fragmentos de la región ITS en levaduras.

Componente	Volumen 1 Reacción	Concentración final
5X Q5 Buffer	5 µL	1X
10 mM dNTPs	0,5 µL	200 µM
10 µM Forward Iniciador	1,25 µL	0,5 µM
10 µM Reverse Iniciador	1,25 µL	0,5 µM
ADN	variable	< 1,000 ng
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,25 µL	0,02 U/µL
5X Q5 High GC Enhancer (opcional)	(5 µL)	(1X)
Agua ultrapura	completar a 25 µL	-

Las condiciones del alineamiento de los iniciadores se determinaron utilizando la herramienta NEB *Tm Calculator*, del proveedor de la enzima Q5. Las condiciones de la amplificación fueron: desnaturalización inicial 98 °C (1ciclo – 30 s), desnaturalización 98 °C (35 ciclos – 10 s), alineamiento 63 °C (35 ciclos – 20 s), extensión 72 °C (35 ciclos – 20 s), extensión final 72 °C (1ciclo – 2 min), almacenamiento 4°C (indefinido), usando los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') descritos por (White *et al.*, 1990; Korabecna, 2007).

El servicio de secuenciación tipo SANGER se realizó a través de CORPOGEN. La secuenciación es realizada por Macrogen Inc. en Corea del Sur. Para ello se utilizó la química del kit “ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing”, electroforesis capilar y el secuenciador ABI PRISM® 3730XL Analyzer (96 capillary type).

2.1.9 Concentración celular

Para determinar la biomasa celular se realizaron medidas de absorbancia a 600 nm a diferentes tiempos de las fermentaciones para conocer el aumento de la masa celular. Las lecturas que se aceptaron son las que se estaban dentro del rango de 0,03 y 0,3 debido a la linealidad del equipo, valores por debajo o por encima subestiman o sobreestiman la cantidad de biomasa. Por tanto, concentraciones por encima del rango se diluían para realizar la correcta medición.

La viabilidad de las células de levaduras analizadas fueron realizadas por los métodos descritos en (Kwolek-Mirek y Zadrag-Tecza, 2014).

2.1.10 Crecimientos y fermentaciones

Las células de levaduras fueron crecidas previamente en medio YPD con glucosa o xilosa como fuente de carbono. Una vez se obtuvo el crecimiento deseado las células fueron centrifugadas a 6000 rpm y lavadas con solución salina para ser usadas como inóculo. Dependiendo de la concentración de células necesaria para iniciar el ensayo, se realizó la medición de la absorbancia y se calculó el volumen de inóculo a usar, usando la fórmula de diluciones químicas representada en la Ecuación (1).

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \quad \text{Ec. (1)}$$

V_1 = volumen inicial en mL

C_1 =concentración inicial absorbancia de la muestra a 600 nm

V_2 = volumen final en mL

C_2 =concentración final absorbancia de la muestra a 600 nm

Las fermentaciones fueron realizadas en medios con diferentes concentraciones de glucosa, xilosa y glucosa+xilosa a temperatura entre 28 °C y 30 °C. Fueron tomadas alícuotas del medio en diferentes tiempos para el análisis del consumo de azúcares, producción de etanol y otros productos.

En algunos ensayos de caracterización de la cepa 202-3 fueron utilizados frascos tapa rosca con capacidad de 100 mL, con 20 mL de medio. También fueron usados frascos taparosca con un sistema *airlock* el cual no permite el ingreso de aire y facilita la evacuación de los gases, generando una condición anaerobia (Figura 2-1).



Figura 2-1 – Frascos utilizados en los crecimientos y fermentaciones. a) Frasco tapa rosca con medio YPD y b) Frasco con sistema *airlock* con hidrolizado.

En el ensayo de comparación de crecimientos de 5 cepas de levaduras, los cultivos fueron realizados en 20 mL de medio YPD (20 g/L de glucosa), 20 mL de medio YPX (20 g/L de xilosa) y 20 mL de YPDX (20 g/L de glucosa+20 g/L de xilosa).

El uso de glucosa como fuente de carbono constituye un control para analizar el comportamiento de las cepas en xilosa como única fuente de carbono y en xilosa+glucosa. Las cepas fueron crecidas por un período de 120 horas y se hizo medición de absorbancia periódicamente en el espectrofotómetro a 600 nm durante los crecimientos.

Las alícuotas de cada una de las muestras tomadas fueron analizadas posteriormente por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) para determinar el consumo de los azúcares y los productos obtenidos.

En los ensayos que diferencian condiciones aerobias, microaerobias y anaerobias en medio Verduyn, fueron utilizadas diferentes configuraciones en el volumen del medio y en los erlenmeyers utilizados. En la condición aerobia fueron utilizados erlenmeyers con deflectores (protuberancias hacia adentro que con agitación aumentan la turbulencia del líquido promoviendo el intercambio de gases entre la fase líquida y gaseosa permitiendo un mayor suministro de oxígeno) con capacidad de 500 mL y 100 mL de medio. En la condición microaerobia fueron utilizados erlenmeyers clásicos con capacidad de 500 mL y 100 mL de medio. En la condición anaerobia fueron utilizados erlenmeyers acoplados a un sistema que no permitía el ingreso de aire con capacidad de 500 mL, con un volumen de medio de 300 mL. El pré-inóculo se realizó usando como fuente de carbono 20 g/L de xilosa. En la Figura 2-2 se encuentra la representación gráfica de las condiciones aerobias, microaerobias y anaerobias de los matraces de Erlenmeyer.

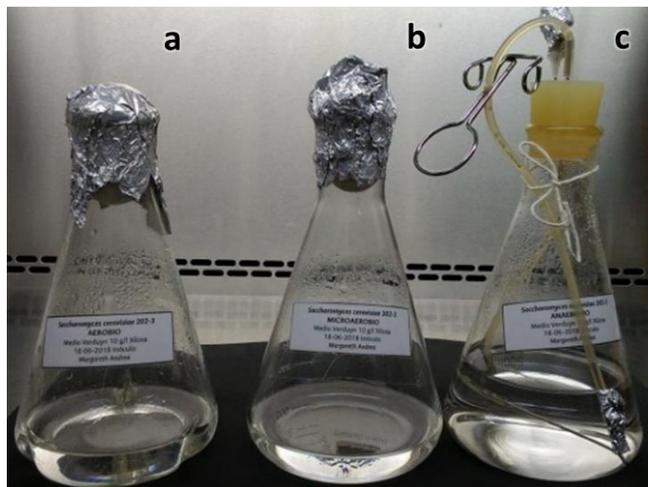


Figura 2-2 – Matracas de Erlenmeyer usados en los ensayos a) en condiciones aerobias, b) microaerobias y c) anaerobias respectivamente.

Los ensayos en reactor fueron realizados en bioreactores Labfors 5 de INFORS HT. Las sales fueron esterilizadas por vapor y los demás compuestos fueron adicionados en la cabina de flujo laminar (antiespumante, vitaminas, elementos traza, fuente de carbono y agua). El termostato se encendió únicamente cuando los sensores estaban sumergidos y se programó la temperatura de trabajo. Estos reactores tienen un volumen de 2 L, usados con volumen máximo de trabajo de 1,2 L y mínimo de 0,5 L. Para mantener el pH en el biorreactor se utilizó Hidróxido de potasio (KOH) 2 M.

Los ensayos en hidrolizados fueron realizados en frascos tapa rosca con sistema *airlock* de 50 mL de capacidad, con un volumen de medio de 40 mL (Figura 2-1).

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y las barras de error en cada gráfica representan la desviación estándar. Los cálculos de rendimientos y balances para cada uno de los productos obtenidos son mostrados en el Anexo G.

2.1.11 Determinación de biomasa celular

En los crecimientos y fermentaciones realizadas se determinaron la concentración de la biomasa celular en g/L de los linajes de levadura. Se realizaron mediciones de absorbancia por triplicado a 600 nm de cada inóculo del microorganismo. Una vez se conocieron las medidas de absorbancia se filtran las muestras usando un filtro con poro de 0,2 μm , cuyo peso seco fue determinado previamente usando la balanza analítica de precisión Sartorius Lab Instruments GmbH & Co, ENTRIS224 – 1S. Previamente, ese filtro fue secado en

estufa por 16 h a 60 °C y después de filtradas las muestras, nuevamente es secado a las condiciones mencionadas midiendo el peso de los filtros usados una vez más.

La determinación de la Biomasa fue calculada con la Ecuación (2) descrita en (Dário 2012)

$$C_{\text{celular}} = \text{Abs}_{\text{muestra}} \cdot D \cdot \text{FC} \quad \text{Ec. (2)}$$

C_{celular} es la concentración de la biomasa celular de la muestra en g/L,

$\text{Abs}_{\text{muestra}}$ es la absorbancia de la muestra a 600 nm,

D es el factor de dilución de la muestra,

FC es el factor de conversión de la absorbancia para peso seco en g/L.

2.1.12 Cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC

El consumo de los azúcares glucosa, xilosa, arabinosa y los productos obtenidos en las fermentaciones (xilitol, glicerol, etanol) fueron identificados por comparación con los tiempos de retención y elución de las soluciones usadas como patrones, teniendo en cuenta lo descrito en (Monošík *et al.*, 2013). También se analizaron ácidos orgánicos como piruvato, lactato, acetato, ácido acético y los aldehídos furfural e hidroximetilfurfural (ver Anexo H).

Las muestras fueron filtradas mediante filtros para jeringa de 0,22 µm de tamaño de poro. Cuando fue requerido se realizaron diluciones con agua estéril ultrapura para completar el volumen de análisis. La fase móvil utilizada fue H₂SO₄ de 5 mM con un flujo de 0,6 mL/min, a una temperatura de 65 °C, con una columna HPX-87H de Bio-Rad y un volumen de inyección de 20 µL.

2.1.13 Amplificación genes involucrados en la metabolización de xilosa

La secuencia de los genes putativos *GRE3*, *GCY1*, *YPR1*, *YJR096W*, *YDL124W*, *XYL2*, *SOR1*, *SOR2*, *XKS1*, involucrados en la metabolización de xilosa fue obtenida de la base de datos de Saccharomyces Genome Database (SGD 2018). Fueron realizados análisis bioinformáticos para el diseño de iniciadores (*primers*) usando el software en línea Primer-Blast de NCBI. En la Tabla 2-2 se tabulan los iniciadores seleccionados. Se tuvo en cuenta que las temperaturas de anidamiento entre ellos fueran de máximo 5 °C de diferencia para el *forward* y *reverse*. Las reacciones en cadena de la polimerasa para las amplificaciones de estos genes se realizaron por separado usando la enzima de alta fidelidad Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase New England BioLabs[®] Inc.

Tabla 2-2 – Secuencia de iniciadores para amplificación de los genes involucrados en la metabolización de xilosa

Iniciador	Secuencia 5'-3'	Tamaño PCR (pb)	Cromosoma	Tamaño del gen (pb)
GRE3-F MP	GTCAGTGCAATCCTTCAAGACG	1070	VIII	984
GRE3-R MP	ACTGGCTGGATCAGGCAAAA			
GCY1-F MP	ACCGGGAGAATCAAGACATTC	1255	XV	939
GCY1-R MP	TTCTGGCATCTGCGGGATTT			
YPR1-F MP	TTTGGAAAAGACTGTGGGCT	1342	IV	939
YPR1-R MP	AGAAGCACTACAGTTGCTGG			
YJR096W-F MP	TAAGCGCGCCATTTTTCCCT	1313	X	849
YJR096W-R MP	ACATCGAAGTCATCGCATCCA			
YDL124W-F MP	ACCCTAAAGAAACGGAGGTCA	1070	IV	939
YDL124W-R MP	GGATGGGTAACGGGGTGATA			
XYL2-F MP	GCCATTCGTTTGGGCAATGG	1486	XII	1071
XYL2-R MP	GAAATTCGCGCCGCTTGTA			
SOR1-F MP	TCACCTTGCTAACCGCATTTTC	1309	X	1074
SOR1-R MP	CATGAACCAAGTGCCGAAAAGT			
SOR2-F MP	AGGCTCAATGTCTTACCGTTC	1215	IV	1074
SOR2-R MP	GGACATGAACCAAGTGCCGA			
XKS1-F MP	GCAATCTCAGGCGGACGAAT	2112	VII	1803
XKS1-R MP	CTCTCTCGTTGCTGGTCGC			

2.1.14 Amplificación gen *XDH1*

En el estudio de (Wenger, Schwartz y Sherlock, 2010) se reportó un nuevo gen denominado *XDH1*. Las cepas que presentaban este gen tuvieron un fenotipo positivo para xilosa. Se analizó la presencia de este gen en la cepa 202-3 usando como control positivo la cepa Lalvin EC 1118[®]. Los iniciadores utilizados para la amplificación fueron los descritos en ese trabajo GSP44 (5'-ATGGCTCCAATCGAAAATCC-3') y GSP45 (5'-TCAGGCCCAAAAATAATGGT-3').

2.1.15 Determinación de ploidía en levaduras

Para determinar la ploidía de la cepa 202-3 se realizó la amplificación de los genes MAT α y MAT α usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las condiciones de la amplificación fueron: desnaturalización inicial 98 °C (1ciclo – 30 s), desnaturalización 98 °C (30 ciclos – 5 s), alineamiento 63 °C (30 ciclos – 20 s), extensión 72 °C (30 ciclos – 20 s), extensión final 72 °C (1ciclo – 2 min), almacenamiento 10 °C (indefinido) usando los iniciadores MAT (5'-AGTCACATCAAGATCGTTTATGG-3'), MAT α (5'-ACTCCAATTCAAGTAAGAGTTTG-3') y MAT α (5'-GCACGGAATATGGGACTACTTCG-

3') descritos por (Huxley, Green y Dunham, 1990). En la Tabla 2-3 se describen los componentes para una reacción de la PCR.

Tabla 2-3 – Mezcla de reacción de PCR para la amplificación de MATa y MAT α .

Componente	Volumen 1 Reacción	Concentración final
5X Q5 Buffer	5 μ L	1X
10 mM dNTPs	0,5 μ L	200 μ M
10 μ M Iniciador MAT	1,25 μ L	0,5 μ M
10 μ M Iniciador MATa	1,25 μ L	0,5 μ M
10 μ M Iniciador MAT α	1,25 μ L	0,5 μ M
ADN	variable	< 1,000 ng
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,25 μ L	0,02 U/ μ L
5X Q5 High GC Enhancer (opcional)	(5 μ L)	(1X)
Agua ultrapura	Completar a 25 μ L	-

Se realizó un análisis de citometría de flujo usando el equipo MUSE[®] Cell Analyzer (EMD Millipore) y el kit de conteo celular, una herramienta que permite monitorear el contenido de ADN y determinar la distribución del ciclo celular. Los materiales usados fueron: medio YPD, *buffer* PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ pH 7,4), Etanol 70%, RNase A y Yoduro de Propidio (PI).

Las células fueron crecidas en YPD con agitación de 150 rpm a 30 °C. Una vez las células se encontraban en la fase estacionaria, se colectaron por centrifugación, se lavaron en el *buffer* PBS, después se resuspendieron en *buffer* PBS con solución de etanol al 70% y se almacenaron a -20°C durante la noche teniendo en cuenta los protocolos descritos por (Bradbury *et al.*, 2006; Sabatinos y Forsburg, 2009).

2.2 Resultados y discusión

2.2.1 Crecimiento y observación microscópica cepa 202-3

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo eucariota, clasificado como hongo microscópico que crece como células individuales (Kurtzman, Fell y Boekhout, 2011). Su tiempo aproximado de generación es de 90 minutos y se producen colonias que contienen millones de células después de sólo 2 días de crecimiento (Grunstein y Gasser, 2013).

Saccharomyces cerevisiae es una levadura reconocida como segura (*Generally Recognized as Safe-GRAS*) (Lin y Tanaka, 2006; Turner *et al.*, 2016), excelente

fermentadora de azúcares para producir etanol, tanto en la presencia de oxígeno como en la ausencia del mismo, tolera bien su producto de fermentación (más del 15% de etanol), y soporta condiciones de acidez, variaciones de temperaturas y estrés osmótico (Reis, 2012). Es el microorganismo más utilizado en la producción de etanol de segunda generación a partir de hidrolizados de lignocelulosa (Zhang, Rodriguez y Keasling, 2011). Presenta una elevada resistencia a los compuestos inhibitorios producidos en los hidrolizados lignocelulósicos, pudiendo convertir compuestos fenólicos en compuestos menos tóxicos (Jönsson, Alriksson y Nilvebrant, 2013). Sin embargo, según la literatura científica, esta levadura no puede metabolizar eficientemente pentosas como la xilosa presente en esos hidrolizados dado que posee una baja expresión de los genes que codifican para las enzimas xilosa reductasa (XR), xilitol deshidrogenasa (XDH) y xilulosa quinasa (XK) necesarias para la metabolización de esta pentosa (Li *et al.*, 2016; Sato *et al.*, 2016; McIlwain *et al.*, 2016; Turner *et al.*, 2016), lo cual corresponde con el dogma científico respecto a que *S. cerevisiae* no puede crecer en xilosa (Hou *et al.*, 2017; Zha, *et al.*, 2014). Contrariamente, algunos reportes muestran que cepas naturales de esta especie pueden crecer en esta fuente de carbono aunque muy lentamente (Attfield y Bell, 2006; Wenger, Schwartz y Sherlock, 2010).

La cepa 202-3, microorganismo de estudio en este proyecto de investigación, es una levadura que muestra una capacidad innata de metabolizar xilosa, con la atractiva característica de pertenecer al género y la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Aunque existen estudios que muestran que algunas cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* son capaces de fermentar xilosa, se refieren a cepas modificadas genéticamente (Matsushika, Watanabe, Kodaki, Makino y Sawayama, 2008; Matsushika, Watanabe, Kodaki, Makino, Inoue, *et al.*, 2008; Matsushika *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2013; Matsushika, Goshima y Hoshino, 2014; Gonçalves *et al.*, 2014; Turner *et al.*, 2016).

Con el objetivo de encontrar la capacidad de utilización de xilosa para su proliferación, la cepa fue crecida en diferentes medios sólidos: medio mínimo YNB, medio rico YPX y medio Verduyn, usando como fuente de carbono 20 g/L de xilosa. La formación de biomasa en presencia de xilosa indica un fenotipo positivo en su asimilación, probablemente por la presencia de una o más enzimas involucradas en el metabolismo de esta fuente de carbono (Devadas *et al.*, 2017; Bhukya, Banoth y Anthappagudem, 2019). Como se observa en la Figura 2-3 las colonias son lisas, planas y de color crema.



Figura 2-3 – Crecimiento de la cepa 202-3 usando xilosa como única fuente de carbono. a) Imagen de la cepa en medio sólido YNB, b) Imagen de la cepa en medio YPX y c) Imagen de la cepa en medio Verduyn.

Se usaron diferentes tipos de medios porque se buscaba confirmar que efectivamente la cepa 202-3 produjera biomasa usando xilosa como fuente de carbono (Figura 2-3). Los medios YNB y Verduyn son medios completamente definidos donde se garantiza que el crecimiento del microorganismo ocurre por la fuente de carbono con la que se suplementan.

En todos los experimentos realizados se realizaron análisis de microscopía óptica para garantizar la pureza de la cepa. Algunas imágenes obtenidas se muestran en la Figura 2-4 (a, b, c, d), donde se puede observar el organismo unicelular, con forma característica de levadura. Las células de la cepa 202-3 se observan ovoides, globosas, aisladas o agrupadas, morfología característica de la especie *S. cerevisiae*. Particularmente, en la Figura 2-4 (d) se puede observar la cepa 202-3 a un aumento de 100x, donde se ven algunas células en estado de gemación.

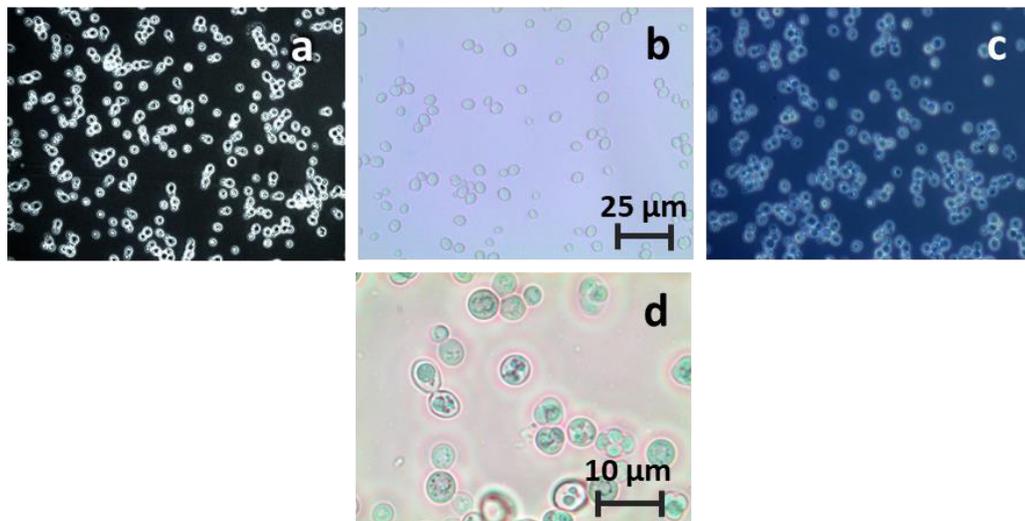


Figura 2-4 – Observación por microscopía óptica de la cepa 202-3. a) Imagen de la cepa 202-3 a 40 X en glucosa, b) Imagen de la cepa 202-3 a 40 X en xilosa, c) Imagen de la cepa 202-3 a 40 X en glucosa+xilosa, d) Imagen de la cepa 202-3 a 100 X.

Estas observaciones fueron muy útiles en todos los ensayos realizados porque permitían controlar que no había problemas de contaminación, las cuales fueron realizadas en cada tiempo donde se tomaban alícuotas para medición de consumo de azúcares y obtención de productos.

Por medio del microscopio electrónico de barrido (SEM) Tescan Vega 3 SB del Departamento de Física de la Universidad Nacional de Colombia se realizaron observaciones adicionales de las cepas 202-3, *Candida tropicalis* 116-5, *S. cerevisiae* Q1 y Ethanol Red. Dicho microscopio opera con un filamento de tungsteno a voltajes de aceleración de electrones desde 200 V hasta 30 kV, con presiones de vacío de 0,009 Pa a 2000 Pa. El microscopio posee actualmente tres detectores: electrones secundarios (SE), electrones retrodispersados (BSE) para observación de imágenes, y de espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (EDX) para análisis elemental, logrando una resolución de imagen de hasta 3 nm.

Las cepas 116-5, Q1 y Ethanol Red se usaron como control para comparación de morfologías con la cepa 202-3. Las observaciones se realizaron desde una magnificación de 1 000X hasta 35 000X. Las imágenes de la Figura 2-5 (a, b y c) corresponden a la cepa 202-3 mostrando las características típicas de una levadura *S. cerevisiae*, con células redondeadas, de tamaño entre 5 μm y 10 μm , algunas con cicatrices de gemación y otras en proceso de gemación.

La micrografía de la Figura 2-5 (d) muestra la imagen de la cepa de levadura *C. tropicalis* 116-5 en la magnificación de 20 000 X. Se puede observar una clara diferencia de morfología con la cepa 202-3, hongo levaduriforme con forma más ovalada que redonda. La micrografía de la Figura 2-5 (e) muestra la imagen de la cepa de levadura *S. cerevisiae* Q1. Aunque es una levadura del género *Saccharomyces*, se aprecia una diferencia con relación a la cepa 202-3. El tamaño de esta cepa es menor y sus células presentan invaginaciones, vale la pena mencionar que la cepa Q1 fue obtenida a partir de una cepa nativa *S. cerevisiae* por proceso de mutagénesis con N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina (MNNG). En la Figura 2-5 (f) se aprecia la micrografía de la cepa Ethanol Red, cepa de levadura *S. cerevisiae* usada en la industria para la producción de biocombustibles.

Las imágenes de microscopía SEM permitieron confirmar el tamaño esperado de las células de la cepa 202-3, observar la morfología típica de este tipo de levaduras y compararla con otras cepas de levadura de su mismo tipo como la cepa Q1 y Ethanol Red

y con otra cepa de levadura de otra especie como la *C. tropicalis* 116-5. Así como la obtención de muestras liofilizadas de la cepa para conservación. Estas muestras liofilizadas después de un año de su conservación presentaban sus mismas características.

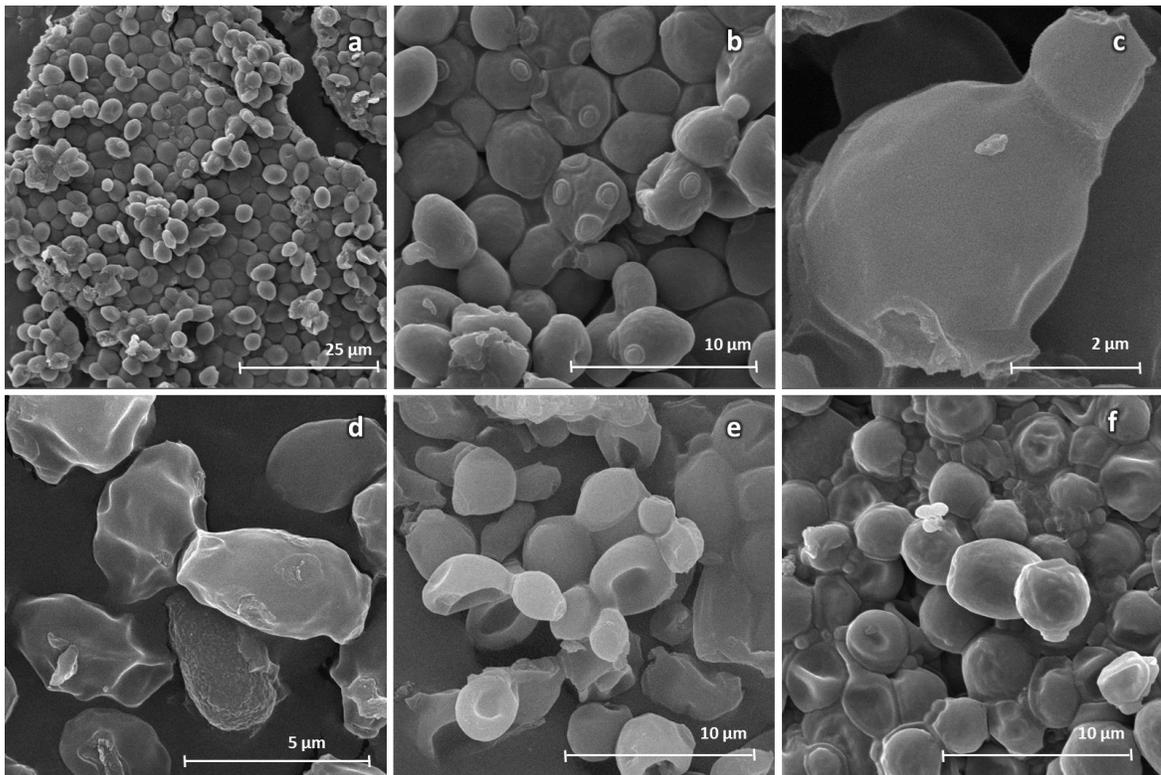


Figura 2-5 – Micrografías obtenidas por observación SEM. a) Micrografía cepa 202-3 con una magnificación de 3 000 X, b) Micrografía cepa 202-3 con una magnificación de 10 000 X, c) Micrografía cepa 202-3 con una magnificación de 35 000 X, d) Micrografía cepa 116-5 con una magnificación de 20 000 X, e) Micrografía cepa Q1 con una magnificación de 10 000 X, f) Micrografía cepa Ethanol Red con una magnificación de 10 000 X.

2.2.2 Confirmación de la especie usando iniciadores específicos

En el estudio de (Muir, Harrison y Wheals, 2011) fueron identificadas correctamente 42 levaduras como *S. cerevisiae* utilizando iniciadores (*primers*) específicos diseñados por ellos, que permiten determinar las diferentes especies del clado *Saccharomyces* (*Saccharomyces* species sensu stricto). Dicha rama está constituida por: *Saccharomyces arboricola*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces paradoxus* y *Saccharomyces pastorianus*, conocido como *Saccharomyces* species sensu stricto. Los iniciadores descritos para *S. cerevisiae* fueron ScerF2 (5'-GCGCTTTACAT

TCAGATCCCGAG-3') y ScerR2 (5'-TAAGTTGGTTGTCAGCAAGATTG-3'). Usando estos iniciadores se realizó una reacción en cadena de la polimerasa con el ADN de la cepa 202-3, donde se obtuvo un fragmento de tamaño esperado de 150 pb para la especie *S. cerevisiae*.

2.2.3 Secuenciación de las regiones ITS

Una vez extraído el ADN genómico de la cepa 202-3 se realizó la cuantificación de cada uno de los ADN obtenidos con el fin de verificar su calidad para la realización de la PCR. La Tabla 2-4 resume los resultados de cuatro extracciones de ADN.

Tabla 2-4 – Resultados extracción de ADN genómico para la cepa 202-3

Cepa	202-3 ¹	202-3 ²	202-3 ³	202-3 ⁴
Concentración [ng/μl]	407,9	450,7	1125,3	1958,8
A 260/280	2,08	2,04	2,06	2,05
A 260/230	2,14	2,15	2,06	2,08

Todas las extracciones de ADN realizadas fueron exitosas ya que se obtuvieron concentraciones de ADN superiores a los 100 ng/μL y su relación de absorbancia fue de A 260/280, superior a 1,8, lo que indica que el ADN tenía una pureza adecuada para la amplificación de la región ITS en la cepa 202-3.

Una vez realizada la PCR se obtuvo un fragmento de las regiones ITS para la cepa 202-3 con el tamaño esperado para *Saccharomyces cerevisiae*, el cual es de aproximadamente 880 pb, teniendo en cuenta lo descrito por (Korabecna, 2007).

Obtenidos los resultados de la secuenciación de ITS1 e ITS4 (Anexo H) se analizó la calidad de las secuencias y se construyó la secuencia consenso usando el programa Serial Cloner 2.0.

La secuencia consenso obtenida se encuentra a continuación:

```
ACCAAATGTTTCCTTCCTGAGAGATTATACACAATACAAAGGAGGCCTCCCCCTTTTTCTGAAGGGGA
GATGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTGAAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAG
AGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTT
GCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTCTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGACAAT
TAAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAA
TCGGGGCCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTC
GTAAGTGGAAATTTTAAAATATTAATAAATTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
CAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG
CCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGA
GTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTC
```

El análisis de esta secuencia fue realizado con la ayuda de BLAST® (Benson et al. 2003), y su resultado permitió concluir que la región ITS de la cepa de levadura 202-3 pertenece a *S. cerevisiae*, teniendo en cuenta que la similitud de las secuencias es superior al 99% (Figura 2-6). Considerando estos y los anteriores resultados se confirmó que la cepa 202-3 es una *Saccharomyces cerevisiae*.

Sequences producing significant alignments									
Download ▼ New Select columns ▼ Show 100 ?									
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results New MISA Viewer									
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae strain YCH497 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal...	Saccharomyces...	1179	1179	91%	0.0	99.39%	1162	KM982975.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae isolate 28 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Saccharomyces...	1175	1175	90%	0.0	99.69%	837	JX497730.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae strain YBA 08 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra...	Saccharomyces...	1173	1173	89%	0.0	100.00%	840	MN158119.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae strain UCDFST:11-194 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S rib...	Saccharomyces...	1173	1173	89%	0.0	100.00%	841	MH595427.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae isolate CM310 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal...	Saccharomyces...	1173	1173	89%	0.0	100.00%	772	MG817620.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae strain SA01 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tran...	Saccharomyces...	1173	1173	89%	0.0	100.00%	842	MK038975.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae strain FC3468 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr...	Saccharomyces...	1173	1173	89%	0.0	100.00%	840	MK439495.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae IFM 57370 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial an...	Saccharomyces...	1173	1173	89%	0.0	100.00%	768	LC413773.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae IFM 40210 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial an...	Saccharomyces...	1173	1173	89%	0.0	100.00%	839	LC413771.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae culture CBS 2888 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Saccharomyces...	1173	1173	89%	0.0	100.00%	1661	KY109257.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cf. cerevisiae/paradoxus culture CBS 6458 small subunit ribosomal RNA gene, partial se...	Saccharomyces...	1173	1173	89%	0.0	100.00%	782	KY105185.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae culture CBS 5287 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; intern...	Saccharomyces...	1173	1173	89%	0.0	100.00%	842	KY105035.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae culture CBS 2888 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; intern...	Saccharomyces...	1173	1173	89%	0.0	100.00%	925	KY105016.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae culture CBS 459 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal...	Saccharomyces...	1173	1173	89%	0.0	100.00%	835	KY105003.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and...	Saccharomyces...	1173	1173	91%	0.0	99.23%	845	KT764941.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae strain AUMC 10265 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribos...	Saccharomyces...	1173	1173	89%	0.0	100.00%	776	KX011599.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae isolate 28 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA...	Saccharomyces...	1173	1173	90%	0.0	99.69%	824	KT175189.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae isolate 27 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Saccharomyces...	1173	1173	89%	0.0	100.00%	840	KT175188.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae YJM681 chromosome XII sequence	Saccharomyces...	1173	84509	89%	0.0	100.00%	1693948	CP006454.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Saccharomyces cerevisiae YJM1573 chromosome XII sequence	Saccharomyces...	1173	71598	89%	0.0	100.00%	1540968	CP006431.1

Figura 2-6 – Resultados de identidad del análisis de la secuencia consenso.

2.2.4 Crecimientos y parámetros cinéticos de cinco levaduras

Aunque la levadura *S. cerevisiae* es una excelente fermentadora de azúcares para producir etanol, no puede metabolizar eficientemente pentosas como la xilosa presente en los hidrolizados lignocelulósicos, dado que posee una baja expresión de los genes que codifican para las enzimas que participan en la metabolización de la xilosa (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1991; Matsushika *et al.*, 2009). Como fue mencionado anteriormente, la cepa de levadura *S. cerevisiae* 202-3 aislada en Colombia tiene la capacidad de metabolizar xilosa de forma reducida. Con el fin de conocer el perfil fenotípico de consumo de xilosa de la cepa 202-3 frente a otras especies de levaduras consumidoras de xilosa y otra *S. cerevisiae*, fueron realizados crecimientos de 5 cepas de levaduras en glucosa, xilosa y glucosa+xilosa. Las cepas de levaduras comparadas fueron: *S. cerevisiae* 202-3,

Scheffersomyces stipitis (ATCC® 90023™) también conocida como *Pichia stipitis*, *Candida tropicalis* 116-3, *Candida tropicalis* 116-5 y *S. cerevisiae* Q1.

En la Figura 2-7 se representa el resultado de perfil de crecimiento de las levaduras en las diferentes fuentes de carbono utilizadas.

Para el crecimiento en glucosa (Figura 2-8) se observó que la mayoría de las cepas consumió la glucosa en menos de 36 horas y produjo etanol a partir de este azúcar. En la presencia de xilosa (Figura 2-9) el consumo del azúcar fue lento e incompleto para la cepa 202-3. La cepa *S. stipitis* usada como referencia en este experimento mostró un consumo del azúcar completo.

La co-fermentación de los azúcares glucosa+xilosa es importante para la eficiente conversión de la biomasa lignocelulósica en combustibles y químicos. Se analizó el comportamiento de las cinco cepas de levaduras en la presencia de estos dos azúcares. Los crecimientos de las cepas *S. stipitis*, 202-3, Q1, 116-3 y 116-5 graficados y mostrados en la Figura 2-10 muestran que el consumo de xilosa fue inhibido por el consumo de la glucosa en todas las cepas analizadas.

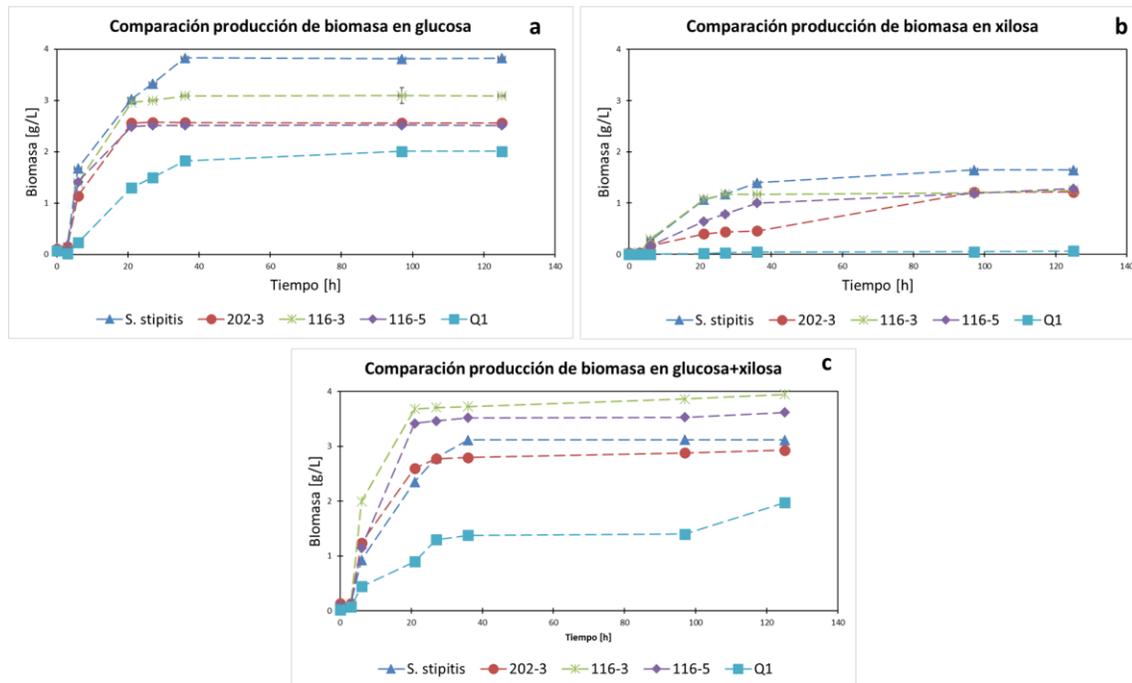


Figura 2-7 – Crecimientos de las cepas *S. stipitis*, 202-3, Q1, 116-3 y 116-5. a) 20 g/L de glucosa, b) 20 g/L de xilosa y 20 g/L de glucosa+20 g/L de xilosa.

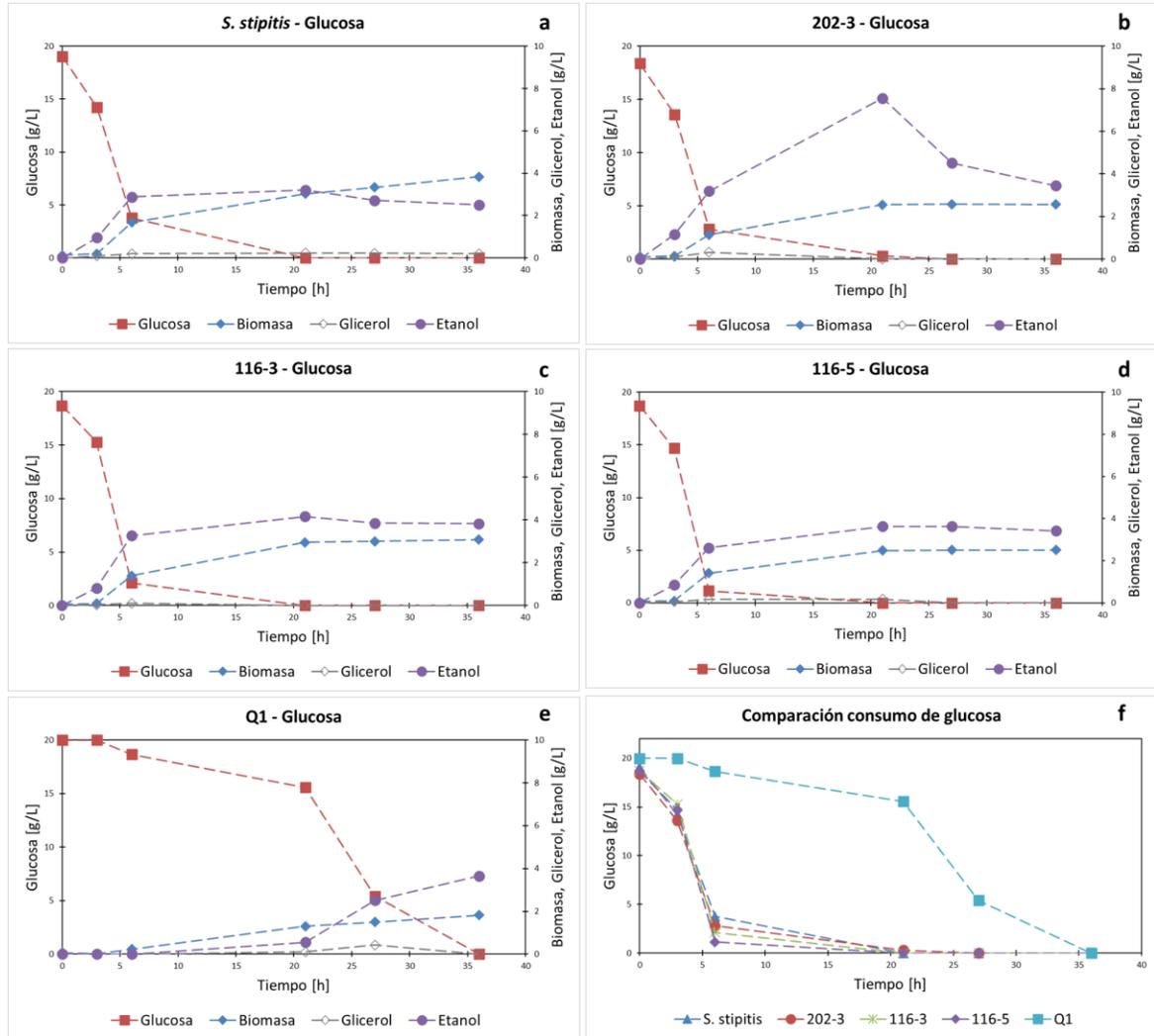


Figura 2-8 – Crecimientos de las cepas en 20 g/L de glucosa, consumo del azúcar y producción de glicerol y etanol. a) *S. stipitis*, b) 202-3, c) 116-3, d) 116-5, e) Q1 y f) Comparación de consumo de glucosa en las 5 cepas.

En la Tabla 2-5 se encuentran tabulados los valores de los parámetros cinéticos para las cepas *S. stipitis*, 202-3, 116-3, 116-5 y Q1 en presencia de 20 g/L de glucosa con su respectiva desviación estándar.

Tabla 2-5 – Parámetros cinéticos de las cepas: *S. stipitis*, 202-3, 116-3, 116-5 y Q1 en glucosa.

Cepa/Glucosa	$Y_{x/s}$ [g/g]	$Y_{EtOH/s}$ [g/g]	$Y_{gli/s}$ [g/g]	$Q_p EtOH$ [g/l,h]	P_x [g/l,h]	μ_{max} [h ⁻¹]
<i>S. stipitis</i>	0,152±0,001	0,168±0,001	0,012±0,001	0,152±0,001	0,103±0,001	0,028±0,001
202-3	0,134±0,001	0,418±0,001	0,021±0,001	0,360±0,001	0,091±0,001	0,125±0,001
116-3	0,155±0,001	0,223±0,001	0,006±0,001	0,198±0,001	0,028±0,004	0,146±0,001
116-5	0,130±0,001	0,194±0,001	0,010±0,001	0,173±0,001	0,023±0,003	0,102±0,001
Q1	0,088±0,001	0,183±0,001	0,029±0,001	0,102±0,001	0,020±0,001	0,071±0,001

Se presenta en la Figura 2-9, los crecimientos de las cepas *S. stipitis*, 202-3, 116-3, 116-5 y Q1 en 20 g/L de xilosa, consumo del azúcar y producción de xilitol y la comparación del consumo de xilosa por las cinco cepas en 20 g/L de xilosa.

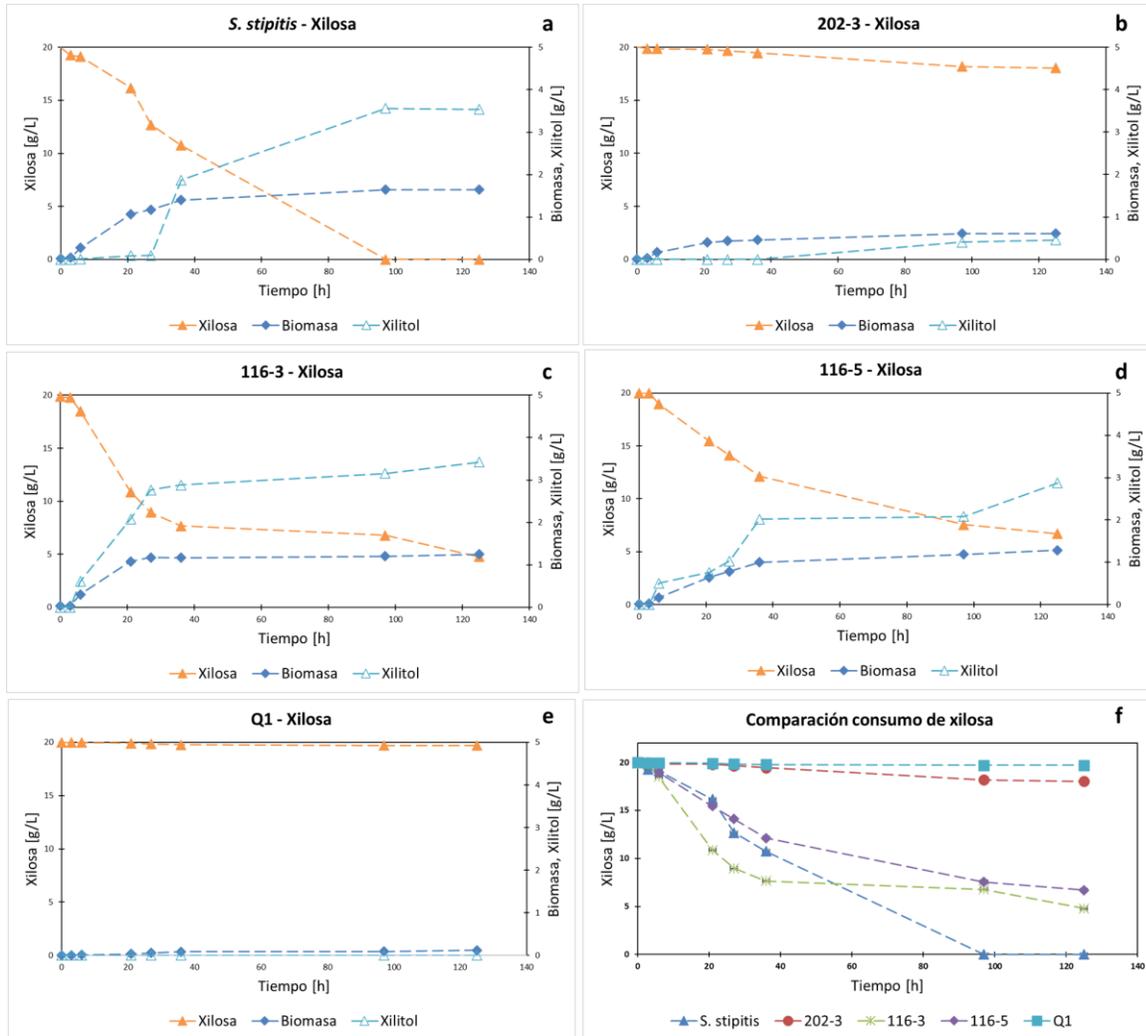


Figura 2-9 – Crecimientos de las cepas en 20 g/L de xilosa, consumo del azúcar y producción de xilitol. a) *S. stipitis*, b) 202-3, c) 116-3, d) 116-5, e) Q1 y f) Comparación de consumo de xilosa en las 5 cepas.

En la Tabla 2-6 se encuentran los valores de los parámetros cinéticos para las cinco cepas de levaduras en la presencia de 20 g/L de xilosa. Como se puede observar en los resultados mostrados en la Figura 2-9, las mejores cepas productoras de xilitol fueron las cepas *S. stipitis*, *C. tropicalis* 116-3 y 116-5, como era de esperarse dadas sus características para metabolizar el azúcar xilosa. Sin embargo, en cuanto al parámetro rendimiento de xilitol las que presentaron los mejores valores fueron las cepas 202-3 y 116-3.

En este ensayo, cuando fueron comparadas las cepas *S. cerevisiae* 202-3 y Q1, se observaron diferencias significativas en su comportamiento en xilosa, registrándose para la cepa 202-3 un consumo de hasta el 9,8 % de la fuente de carbono usando este diseño experimental, mientras que la cepa Q1 no tuvo consumo del azúcar, tal como se puede observar en la Figura 2-9. Este comportamiento metabólico en xilosa para una cepa *S. cerevisiae* es muy interesante teniendo en cuenta que se considera que *S. cerevisiae* no puede metabolizar xilosa como única fuente de carbono, a pesar de que en la literatura científica ha sido reportado que algunas cepas de esta especie han logrado consumir xilosa, aunque mínimamente. La cepa *S. cerevisiae* BY4741 presentó consumo de hasta 5 % del azúcar en 10 días con una concentración de xilosa de 40 g/L (Träff, Jönsson y Hahn-Hägerdal, 2002; Patiño *et al.*, 2019).

En el trabajo de (Gong *et al.*, 1983) fue reportado el consumo de xilosa en algunas cepas de *S. cerevisiae* en condiciones fermentativas y aerobias alcanzado en 3 días con una concentración de xilosa de 50 g/L: ATCC 4126 (consumo de 1,18 % de xilosa), ATCC 9763 (0,84 %), ATCC 24553 (0,88 %), ATCC 24857(1,35 %), ATCC 24859 (1,32 %), ATCC 26497 (1,32 %), ATCC 26603 (0,51 %), ATCC 26785 (0,68 %). En este mismo estudio en condiciones aeróbicas las que presentaron un mejor consumo de la pentosa fueron las cepas ATCC 26497 (3,25 %) y la cepa ATCC 26603 (1,04 %). Por otra parte, los resultados de nuestra investigación en las condiciones de trabajo reportadas muestran que la cepa 202-3 objeto de estudio alcanzo un consumo de xilosa muy superior (9,8 %) en 5,2 días.

Tabla 2-6 – Parámetros cinéticos de las cepas *S. stipitis*, 202-3, 116-3, 116-5 y Q1 en xilosa.

Cepa/Xilosa	$Y_{x/s}$ [g/g]	$Y_{xii/s}$ [g/g]	P_x [g/l.h]	μ_{max} [h ⁻¹]
<i>S. stipitis</i>	0,081±0,001	0,178±0,002	0,017±0,001	0,056±0,001
202-3	0,304±0,001	0,233±0,004	0,010±0,002	0,034±0,001
116-3	0,081±0,001	0,227±0,006	0,010±0,001	0,122±0,002
116-5	0,095±0,001	0,216±0,005	0,010±0,001	0,061±0,001
Q1	0,393±0,002	0,000±0,001	0,001±0,001	0,009±0,001

De las cinco cepas analizadas, la 202-3 y la 116-3 fueron las que presentaron mejores rendimientos de xilitol en las condiciones evaluadas (ver Anexo I). En el caso de la cepa 116-3 es de esperarse un consumo del azúcar y una producción de xilitol dado que es una característica típica de las levaduras *C. tropicalis*. Por tanto, la cepa 202-3 se configura

como objeto de estudio y de mejoramiento dada su especie, su capacidad innata de crecer en la pentosa de interés y de metabolizarla.

En la presencia de xilosa, *S. cerevisiae* sufre represión por la glucosa cuando ambos azúcares son usados como fuente de carbono (Trumbly, 1992; Carlson, 1999; Jeffries y Shi, 1999; Westergaard *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2009; Subtil y Boles, 2012). En el crecimiento con las fuentes de carbono glucosa+xilosa (Figura 2-10) se observó una preferencia de cada una de las cepas por la glucosa, siendo consumida totalmente. El consumo de xilosa fue incompleto para todas las cepas, aunque el mejor perfil fue el presentado por la cepa *S. stipitis*. Los resultados en la producción de etanol para esa condición pueden ser atribuidos al consumo de esa hexosa (glucosa).

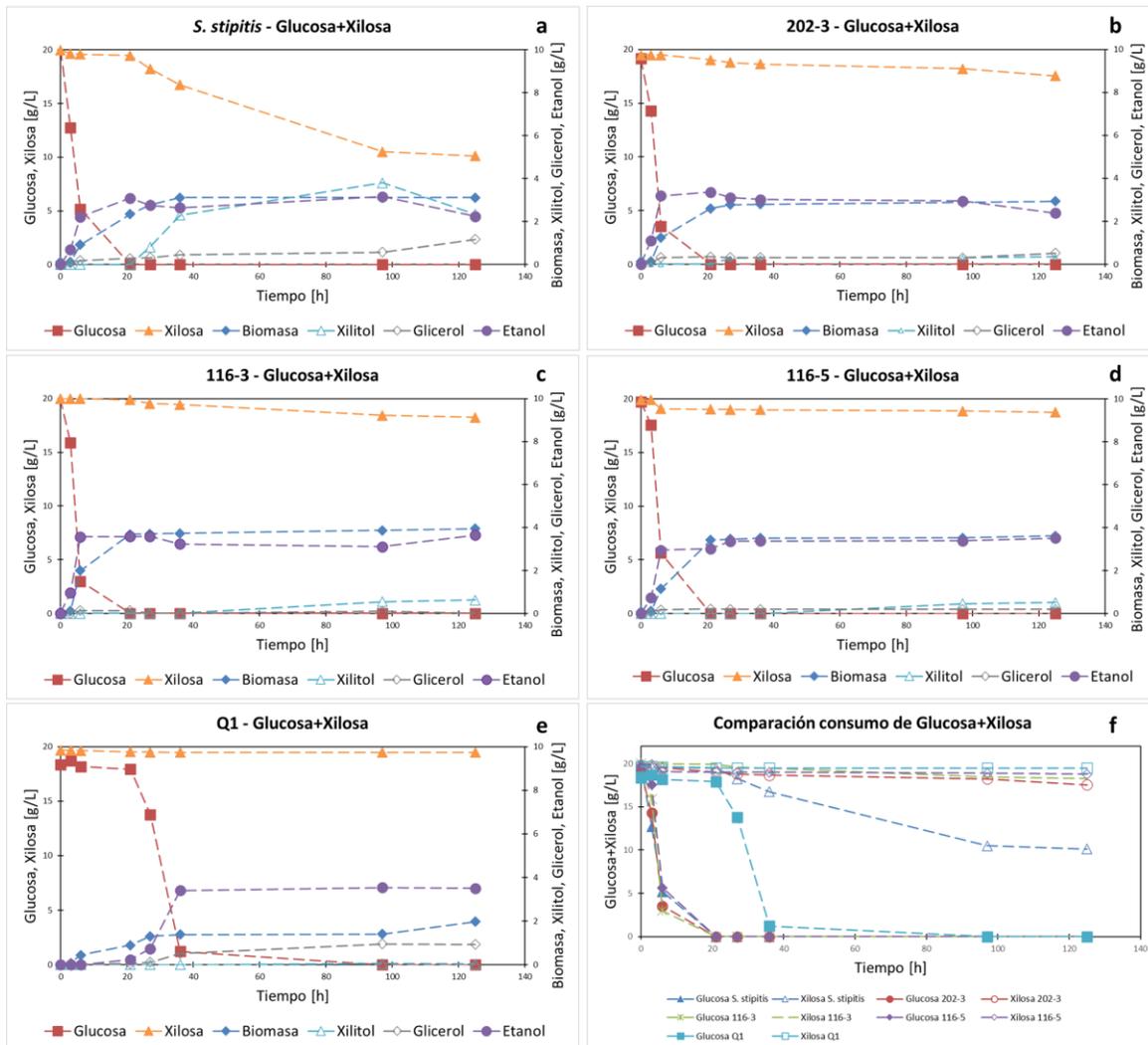


Figura 2-10 – Crecimientos de las cepas de levaduras en 20 g/L de xilosa y 20 g/L de glucosa, consumo de los azúcares, producción de xilitol, glicerol y etanol. a) *S. stipitis*, b) 202-3, c) 116-3, d) 116-5, e) Q1 y f) Comparación de consumo de glucosa+xilosa en las 5 cepas.

En la Tabla 2-7 se encuentran los valores de los parámetros cinéticos para las cinco cepas analizadas en la presencia de 20 g/L de glucosa+20 g/L xilosa.

Tabla 2-7 – Parámetros cinéticos de las cepas *S. stipitis*, 202-3, 116-3, 116-5 y Q1 en glucosa+xilosa.

Cepa /G+X	$Y_{x/s}$ [g/g]	$Y_{xil/s}$ [g/g]	$Y_{gli/s}$ [g/g]	$Y_{EtOH/s}$ [g/g]	$Q_p EtOH$ [g/l,h]	P_x [g/l,h]	μ_{max} [h ⁻¹]
<i>S. stipitis</i>	0,101±0,001	0,402±0,001	0,040±0,001	0,108±0,001	0,033±0,001	0,031±0,001	0,042±0,001
202-3	0,132±0,001	0,178±0,003	0,025±0,001	0,171±0,001	0,160±0,001	0,022±0,001	0,099±0,001
116-3	0,179±0,001	0,363±0,001	0,007±0,001	0,168±0,001	0,029±0,001	0,031±0,001	0,111±0,001
116-5	0,169±0,001	0,445±0,001	0,011±0,001	0,168±0,001	0,028±0,001	0,028±0,001	0,117±0,001
Q1	0,106±0,001	0,000±0,001	0,052±0,003	0,191±0,001	0,036±0,001	0,016±0,001	0,040±0,001

2.2.5 Comparación comportamiento cinético de la cepa 202-3 en diferentes recipientes

En la Figura 2-11 se muestran los resultados de un experimento que se realizó con la cepa 202-3 usando 20 mL de medio YPX en frasco tapa rosca de volumen de 100 mL (muestras A, B, C, D) y 50 mL de medio YPX en Erlenmeyer con capacidad de 250 mL (E, F, G, H). Este ensayo se diseñó y realizó porque en experimentos preliminares (datos no mostrados) no se observaron diferencias significativas en relación con la asimilación de azúcares usando frascos taparosca o Erlenmeyer con un volumen de medio de 1/5 en relación con el volumen del frasco. Conocer las diferencias permitiría usar una menor cantidad de medio y reactivos para los diferentes ensayos con la cepa. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con relación al etanol, es posible que haya una evaporación mayor en los Erlenmeyer que en los frascos taparosca.

Las muestras denominadas A y E contenían 20 g/L de glucosa, las muestras B y F 20 g/L de xilosa, las muestras C y G 10 g/L glucosa+10 g/L de xilosa, las muestras D y H se denominaron controles negativos del experimento.

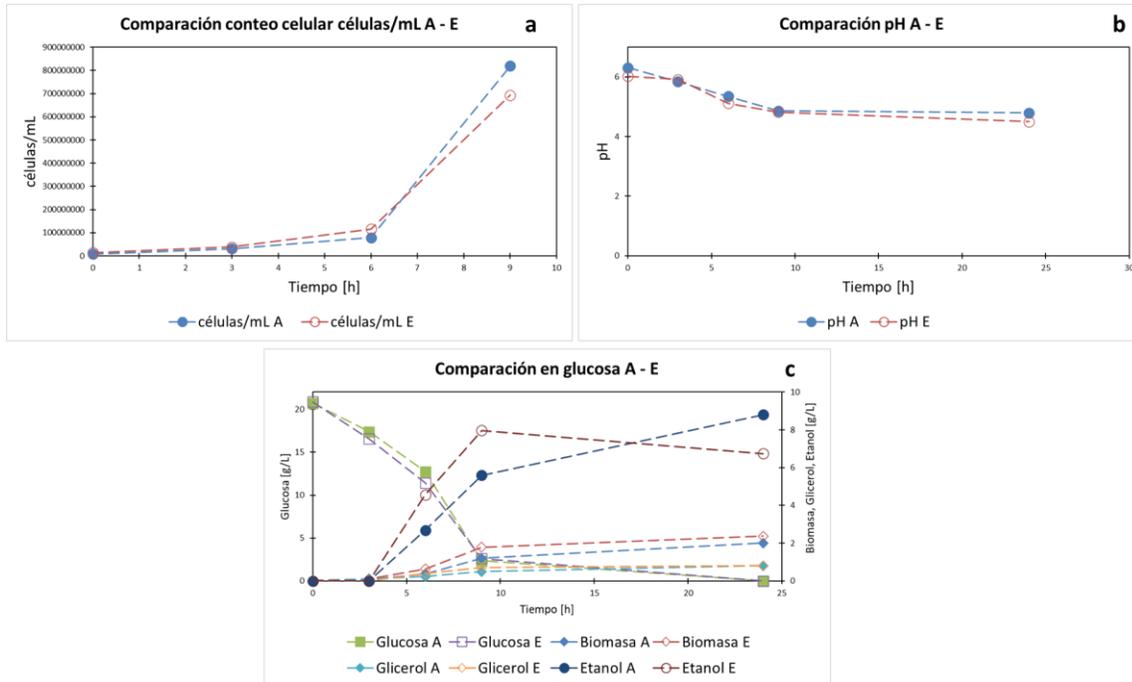


Figura 2-11 – Relación de la cepa 202-3 en diferentes recipientes condición A (frasco taparosca) y condición E (Erlenmeyer) en medio YPD [20 g/L glucosa]. a) Comparación conteo celular, b) Comparación variación de pH y c) Comparación en glucosa, consumo del azúcar y producción de biomasa, glicerol y etanol.

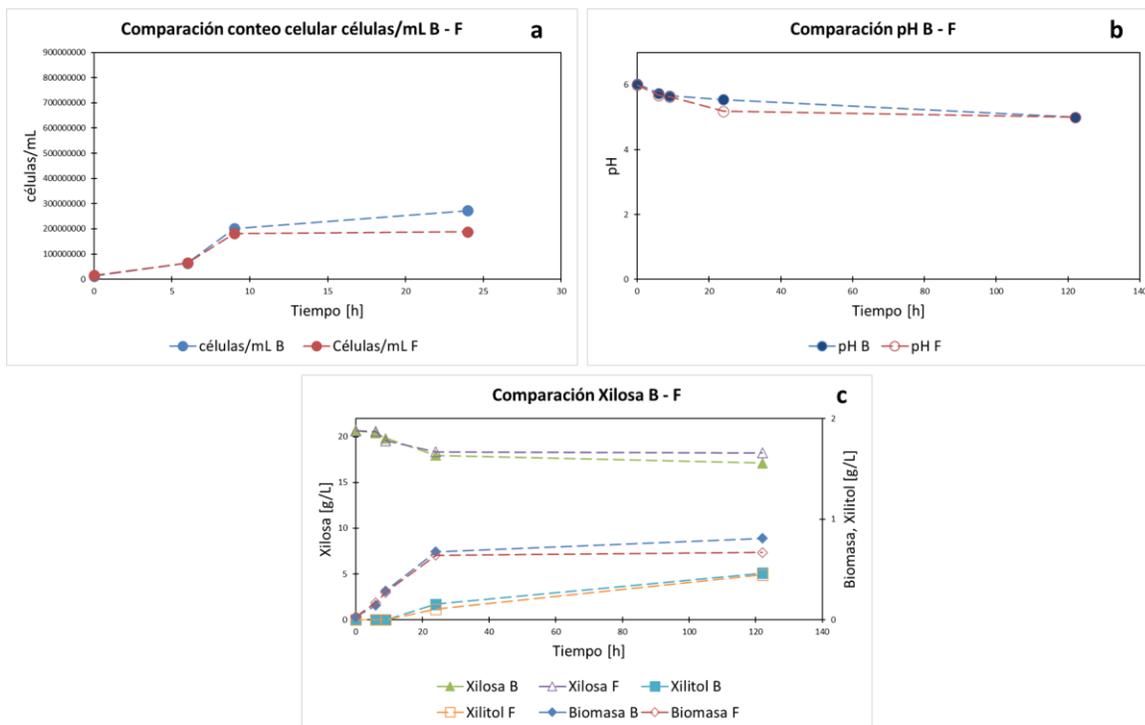


Figura 2-12 – Relación de la cepa 202-3 en diferentes recipientes condición B (frasco taparosca) y condición F (Erlenmeyer) en medio YPX [20 g/L xilosa]. a) Comparación conteo celular, b) Comparación variación de pH y c) Comparación en xilosa, consumo del azúcar y producción de biomasa y xilitol.

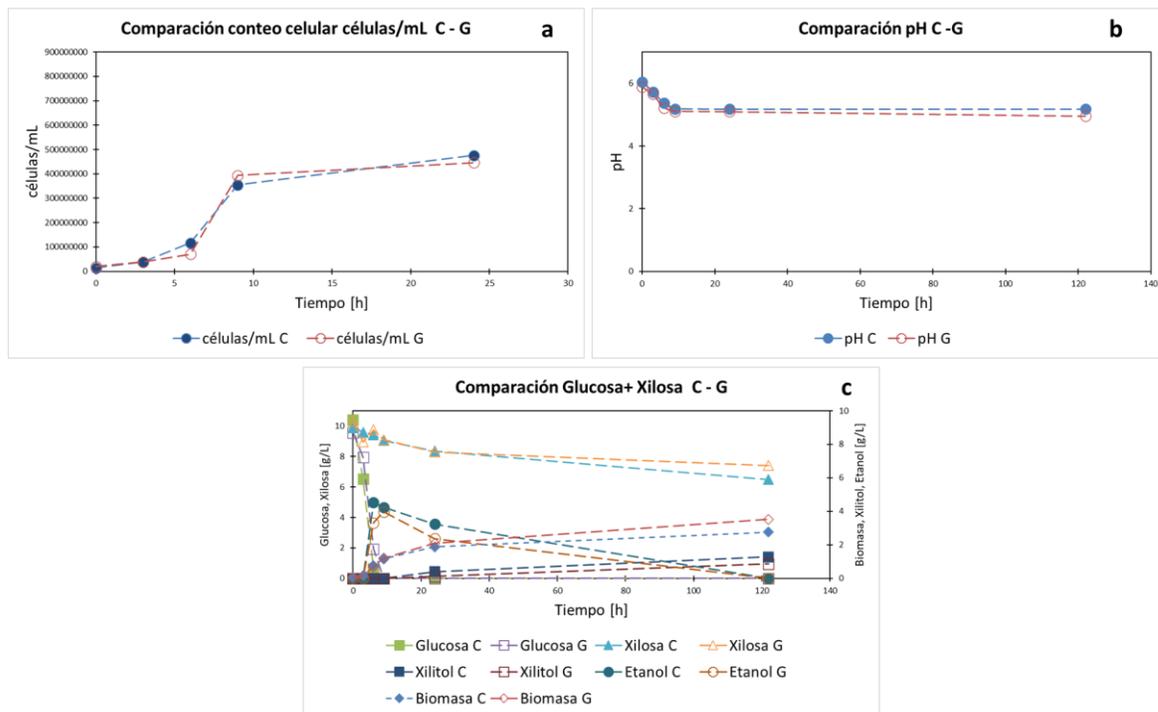


Figura 2-13 – Relación de la cepa 202-3 en diferentes recipientes condición C (frasco taparosca) y condición G (Erlenmeyer) en medio YPDx [10 g/L glucosa+10 g/L xilosa]. a) Comparación conteo celular, b) Comparación variación de pH y c) Comparación en glucosa+xilosa, consumo de azúcares y producción de biomasa, xilitol y etanol.

2.2.6 Caracterización fenotípica de la cepa *S. cerevisiae* 202-3 en diferentes condiciones

Con el fin de establecer el perfil fenotípico de la cepa 202-3 frente al consumo de xilosa, fueron realizados ensayos de crecimiento y fermentación en diferentes condiciones de concentración del sustrato inicial, disponibilidad de oxígeno, medios y ubicación geográfica, teniendo en cuenta que se realizaron ensayos en Bogotá, Colombia a 2600 msnm y en São Paulo, Brasil a 760 msnm. En medio rico YPD se utilizó glucosa como fuente de carbono, en medio YPX se usó xilosa, y en medio YPDx glucosa+xilosa. En medio Verduyn se hicieron crecimientos en glucosa, xilosa, y glucosa+xilosa como fuente de carbono.

Adicionalmente, se realizó una fermentación en un hidrolizado lignocelulósico obtenido mediante el procedimiento del protocolo “Obtención de un hidrolizado lignocelulósico” de nuestro Grupo de Investigación (Lancheros-Castaneda, Fonseca, y Lozano 2015), basado en el trabajo de (Carvalho *et al.*, 2004).

A continuación, se muestran los resultados de la cepa en relación con el consumo de glucosa y la producción de etanol, en condiciones microaerobias (frasco taparosca) y en condiciones anaerobias (con adaptación del sistema *airlock*). Estos crecimientos fueron realizados en medio rico YPD en Bogotá. Durante la pasantía en la Universidade de São Paulo en Brasil, se tuvo disponibilidad de ingredientes necesarios para la preparación del medio completamente definido Verduyn, medio sintético compuesto con sales, elementos traza y vitaminas, en el cual la única fuente de carbono es el azúcar de interés. Por esa razón, se realizó un crecimiento en glucosa en condiciones microaerobias usando este medio. Teniendo en cuenta los resultados mostrados anteriormente del fenotipo de la cepa en glucosa, se hizo acompañamiento al ensayo por 12 horas. Al igual que en el medio rico YPD, el azúcar fue consumido en menos de 12 horas, lo cual demostró que independiente del tipo de medio utilizado, la cepa 202-3 es una excelente fermentadora de hexosas como la glucosa, mejor aún que cepas industriales ampliamente utilizadas (Li *et al.*, 2015).

En la Figura 2-14 (a) se muestra el crecimiento de la cepa 202-3 en glucosa en condiciones microaerobias en medio rico YPD (Bogotá, Colombia), Figura 2-14 (b) en medio Verduyn (São Paulo, Brasil) y en la Figura 2-14 (c) el consumo de glucosa y producción de etanol por la cepa 202-3 en condiciones anaerobias (*airlock*) en medio YPD (Bogotá, Colombia).

En la Tabla 2-8 se tabulan los valores de los parámetros cinéticos para la cepa 202-3 en condiciones microaerobias y anaerobias. Para las condiciones evaluadas se observa un consumo completo de glucosa en un tiempo menor a 12 horas y para condición anaerobia un rendimiento de producción de etanol de 0,491 g/g, cercano al teórico de 0,511 g/g. Para la condición microaerobia en medio rico YPD se obtuvo rendimiento de 0,491 g/g y en medio Verduyn con glucosa de 0,467 g/g. Los altos rendimientos observados para la producción de etanol en ambas condiciones pueden indicar una menor expresión de genes respiratorios en la levadura. Esto permitiría, teniendo en cuenta el ciclo de Krebs, que la cepa realice glucólisis en lugar de producir biomasa.

Los valores de rendimiento alcanzados de esta cepa en glucosa son superiores a valores descritos para cepas industriales de *S. cerevisiae* (Li *et al.*, 2015; Basso *et al.*, 2008), lo cual es muy interesante porque podría ser utilizada para la obtención de etanol de primera generación.

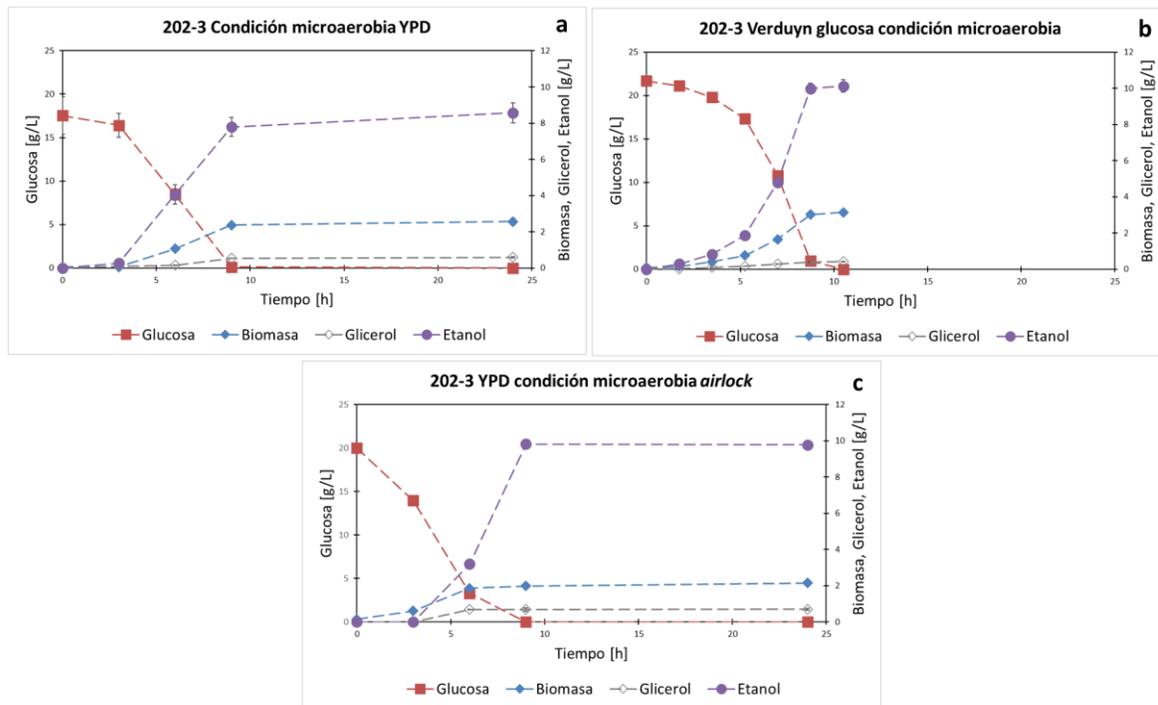


Figura 2-14 – Crecimiento de la cepa 202-3 en glucosa en condiciones microaerobias. a) en medio rico YPD (Bogotá – Colombia), b) en medio Verduyn (São Paulo – Brasil) y c) en condiciones anaerobias (*airlock*) en medio YPD (Bogotá – Colombia).

Tabla 2-8 – Parámetros cinéticos de consumo de glucosa por la cepa 202-3.

202-3/Glucosa	$Y_{x/s}$ [g/g]	$Y_{gli/s}$ [g/g]	$Y_{EtOH/s}$ [g/g]	P_x [g/L.h]	$Q_p EtOH$ [g/L.h]	μ_{max} [h ⁻¹]
Microaerobio-YPD	0,144±0,010	0,034±0,005	0,491±0,030	0,102±0,003	0,357±0,023	0,631±0,006
Microaerobio-Verduyn Glucosa	0,141±0,001	0,020±0,001	0,467±0,010	0,289±0,002	0,965±0,033	0,383±0,002
Airlock-YPD	0,100±0,001	0,035±0,003	0,491±0,003	0,084±0,001	1,091±0,008	0,291±0,001

Con la intención de conocer el perfil fenotípico en la cepa 202-3 se analizó el consumo de la pentosa xilosa en condiciones microaerobias y anaerobias en medio YPX. En la Figura 2-15 se muestra el consumo de xilosa y producción de xilitol por la cepa 202-3 en condiciones microaerobias en dicho medio. Igual que para los gráficos anteriores, las barras de error indican la desviación estándar para 3 ensayos realizados.

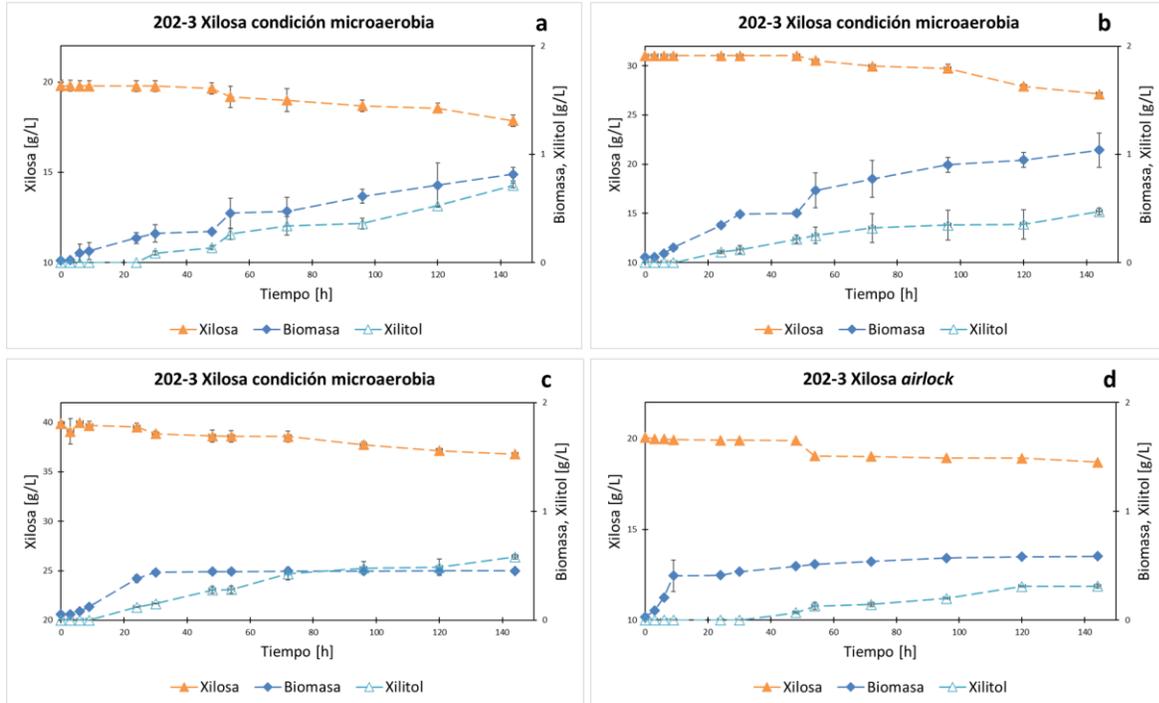


Figura 2-15 – Consumo de xilosa y producción de xilitol por la cepa 202-3. a) en condiciones microaerobias en medio YPX 20 g/L, b) en condiciones microaerobias en medio YPX 30 g/L, c) en condiciones microaerobias en medio YPX 40 g/L y d) en condiciones anaerobias en medio YPX 20 g/L. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios de 3 ensayos en las mismas condiciones.

En la Tabla 2-9 se encuentran los valores de los parámetros cinéticos de crecimiento para la cepa 202-3 en condiciones microaerobias y anaerobias relacionados con el consumo de xilosa.

Tabla 2-9 – Parámetros cinéticos de crecimiento de la cepa 202-3 en xilosa en condiciones microaerobias y anaerobias.

202-3/Xilosa	$Y_{x/s}$ [g/g]	$Y_{xii/s}$ [g/g]	P_x [g/L.h]	μ_{max} [h ⁻¹]
Micro-YPX 20 g/L	0,412±0,032	0,368±0,016	0,006±0,001	0,014±0,004
Micro-YPX 30 g/L	0,253±0,037	0,121±0,009	0,007±0,001	0,013±0,001
Micro-YPX 40 g/L	0,129±0,001	0,188±0,014	0,003±0,001	0,063±0,001
Airlock-YPX 20 g/L	0,410±0,007	0,230±0,010	0,004±0,001	0,005±0,004

En la Figura 2-16 se grafican los resultados de consumo de xilosa y glucosa en condiciones microaerobias por la cepa 202-3 (a) y en condiciones anaerobias (b) en medio YPDx (20 g/L glucosa+20 g/L xilosa). En la Tabla 2-10 se encuentran los parámetros cinéticos de crecimiento.

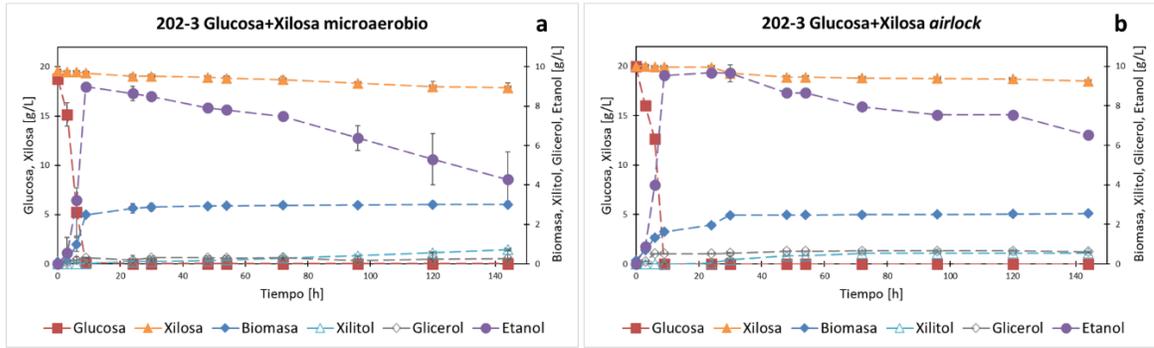


Figura 2-16 – Consumo de glucosa+xilosa por la cepa 202-3 en medio YPD [20 g/L glucosa y 20 g/L xilosa]. a) en condiciones microaerobias y b) en condiciones anaerobias. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas.

En la Figura 2-17 se muestra el crecimiento de la cepa 202-3 en presencia de 2 g/L de glucosa y 8 g/L de xilosa. Aunque la pequeña cantidad de glucosa permitió un consumo de 27,69 % de la xilosa en las primeras 14 horas, al cabo de más de 200 horas de experimento sólo se consumió 33,22 % del azúcar.

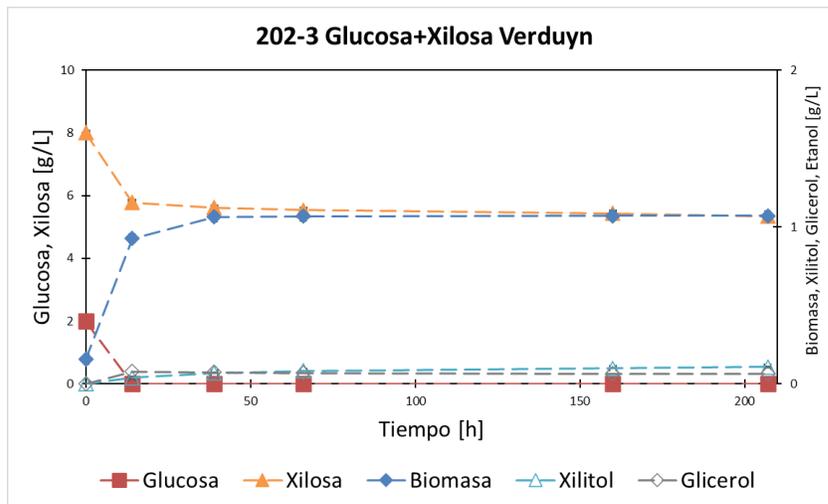


Figura 2-17 – Crecimiento de la cepa 202-3 en medio Verduyn [2 g/L glucosa+8 g/L xilosa].

Sin embargo, es muy interesante lo que ocurrió en este ensayo porque al parecer la cantidad adicionada de glucosa le permitió a la cepa mejorar su captación por xilosa favoreciendo el transporte de este azúcar a la célula. La captación de xilosa en *S. cerevisiae* ocurre por difusión facilitada (Batt *et al.*, 1986; Van Zyl *et al.*, 1989) siendo transportada por algunas permeasas de hexosas con baja afinidad por la pentosa de la familia de genes *HXT* (Stambuk *et al.*, 2008; Smith, van Rensbeurg y Görgens, 2014). Se sugiere que la cantidad de glucosa permitió la sobreexpresión de esos genes permitiendo

que en las primeras horas del experimento la xilosa ingresará al interior de la célula con mayor facilidad.

Se realizó una fermentación con la cepa 202-3 en un hidrolizado de bagazo de caña de azúcar. La glucosa fue consumida totalmente en menos de 12 horas y se observó un consumo de la xilosa de 35% y un consumo de arabinosa del 11% al completar 96 horas. Se midió presencia de ácido acético (3 g/L) y de hidroximetilfurfural (0,05 g/L) en el hidrolizado inicial. Estos valores no tuvieron una variación significativa durante el desarrollo del experimento. En la Figura 2-18 se observa el consumo de azúcares y la obtención de productos.

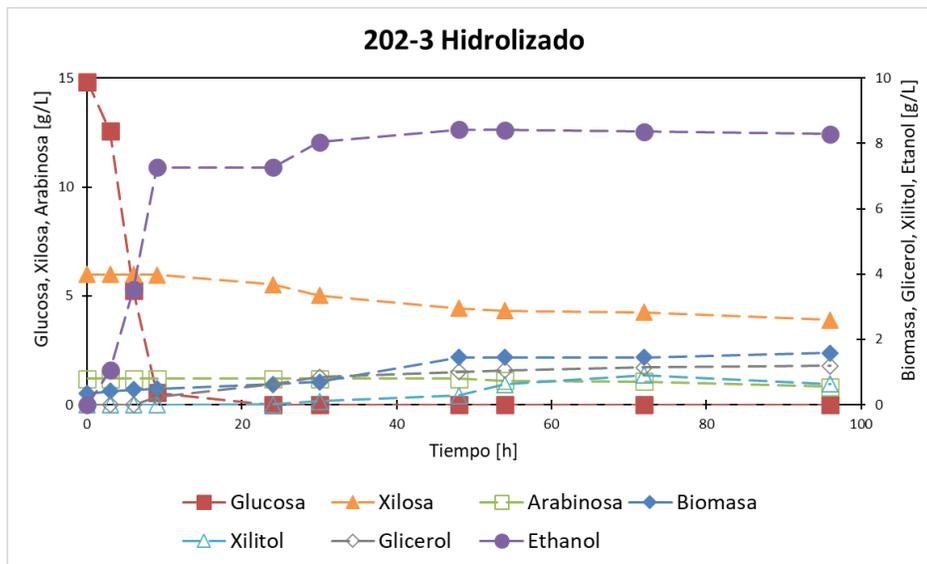


Figura 2-18 – Fermentación de la cepa 202-3 en hidrolizados.

El consumo de xilosa por la cepa 202-3 en hidrolizados es superior a lo reportado previamente por el grupo de investigación, pero estos resultados no son comparables pues la duración de sus ensayos fue de 48 horas comparados con las 96 horas de este trabajo. Adicionalmente, los hidrolizados de bagazo de caña usados en el trabajo previo del grupo son diferentes en cuanto a concentración de azúcares e inhibidores. En ese trabajo la concentración de glucosa fue de 70 g/L, de xilosa de aproximadamente 30 g/L, ácido acético 7 g/L, furfural 0,2 g/L e hidroximetilfurfural 0,6 g/L (Velásquez y Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos 2015).

En la Tabla 2-10 se encuentran los valores de los parámetros cinéticos para la cepa 202-3 en condiciones microaerobias y anaerobias relacionados con el consumo de glucosa+xilosa en medio YPX, en medio Verduyn y en hidrolizados de caña de azúcar.

Tabla 2-10 – Parámetros cinéticos de crecimiento de la cepa 202-3 en glucosa+xilosa.

202-3/ Glucosa+Xilosa	$Y_{x/s}$ [g/g]	$Y_{xii/s}$ [g/g]	$Y_{gii/s}$ [g/g]	$Y_{EtOH/s}$ [g/g]	P_x [g/l.h]	$Q_p EtOH$ [g/l.h]	μ_{max} [h ⁻¹]
Micro-YPDX 20 g/L	0,143±0,017	0,421±0,090	0,016±0,004	0,476±0,005	0,024±0,002	0,998±0,004	0,078±0,008
Airlock-YPDX 20 g/L	0,110±0,002	0,370±0,055	0,031±0,002	0,481±0,005	0,020±0,001	0,403±0,001	0,035±0,001
Micro-Verduyn G+X	0,197±0,003	0,040±0,001	0,018±0,001	0,000±0,001	0,005±0,001	0,000±0,001	0,044±0,001
Airlock-Hidrolizados	0,072±0,001	0,521±0,009	0,067±0,002	0,513±0,005	0,013±0,001	0,176±0,001	0,028±0,001

A continuación, en la Figura 2-19 se observan los resultados del crecimiento de la cepa 202-3 en medio Verduyn usando xilosa como fuente de carbono. En este ensayo se utilizaron diferentes configuraciones de matraces de Erlenmeyer que simulaban las condiciones aerobias, microaerobias y anaerobias. En la condición denominada aerobia se usaron matraces de Erlenmeyer que presentan deflectores (protuberancias en la base) que con la agitación promueven el intercambio de gases permitiendo un mayor suministro de oxígeno. En la condición denominada microaerobia se usaron matraces clásicos de Erlenmeyer con tapón de algodón y en la condición denominada anaerobia fueron usados matraces de Erlenmeyer acoplados a un sistema que no permitía el ingreso de aire (Ver Figura 2-2). Con este ensayo se pudo realizar un análisis del consumo de xilosa por la cepa y la producción de xilitol en las condiciones analizadas. Dado que reportes de la literatura han descrito para otras cepas de levaduras fermentadoras de xilosa que la disponibilidad de oxígeno es un factor importante en la producción de xilitol, fue analizado el comportamiento de la cepa frente a esta condición en medio completamente definido Verduyn a una concentración de 10 g/L del azúcar.

Dados los resultados obtenidos en la producción de xilitol se sugiere que para esta cepa las mejores condiciones de cultivo son las denominadas microaerobias (ver Anexo J). De acuerdo con los resultados obtenidos en este experimento con medio Verduyn y en experimentos anteriores con medio YPX, se observó que la mejor condición para la producción de xilitol es la que se consideró microaerobia. Es bien conocido que el oxígeno juega un papel importante en la producción de xilitol por la levadura siendo favorecida en condiciones microaerobias (Morais *et al.*, 2013). Esto podría ser explicado porque en la ruta de las pentosas fosfato de levaduras la enzima xilosa reductasa XR dependiente del

cofactor NADPH reduce la xilosa a xilitol; la enzima xilitol deshidrogenasa XDH dependiente del cofactor NAD⁺ oxida el xilitol para convertirlo en xilulosa; se genera un desbalance redox entre esos cofactores que permite la acumulación del metabolito xilitol si la regeneración de NAD⁺ resulta ineficiente pues ambos cofactores tienen diferentes requerimientos de oxígeno. En otros estudios se ha demostrado que este tipo de condición es ventajosa para la producción de xilitol en *Candida magnoliae* alcanzando un rendimiento de 0,75 g/g, correspondiente al 82% del rendimiento teórico (Nakano *et al.*, 2000). El rendimiento de xilitol alcanzado en esta condición fue de 0,249 g/g.

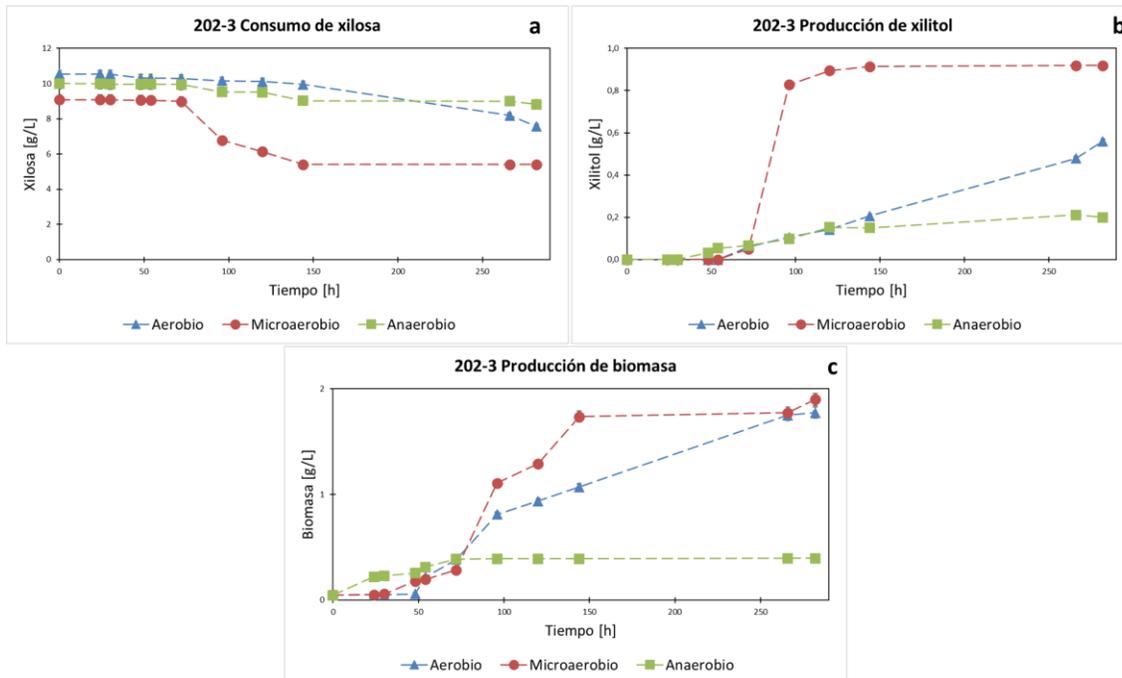


Figura 2-19 – Crecimiento de la cepa 202-3 en medio Verduyn 10 g/L de xilosa, aerobio, anaerobio y microaerobio. a) Comparación consumo de xilosa en las diferentes condiciones, b) Comparación producción de xilitol en las diferentes condiciones y c) Comparación producción de biomasa en las diferentes condiciones.

El resultado obtenido en este ensayo puede estar relacionado a que en condiciones microaerobias ocurre una acumulación de NADP⁺ y NADH (Bruinenberg *et al.*, 1984), generando el desequilibrio redox intracelular. Por lo cual se puede sugerir que con las condiciones microaerobias se está favoreciendo la regeneración del NADPH en la ruta de las pentosas fosfato mejorando la obtención de xilitol.

La Figura 2-20 representa el resultado de una fermentación en reactor INFORTS HT que se realizó con la cepa 202-3 en medio Verduyn usando como fuente de carbono 20 g/L de xilosa. Durante todo el proceso, el pH se mantuvo en aproximadamente en 6,0, la temperatura en 28 °C y la agitación en 800 rpm.

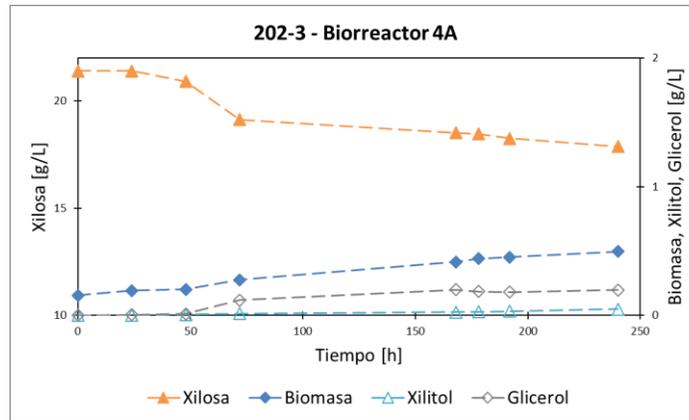


Figura 2-20 – Crecimiento de la cepa 202-3 en biorreactor en medio Verduyn 20 g/L de xilosa.

En la Figura 2-21 se muestran los resultados de crecimiento de la cepa 202-3 en reactor INFORS HT con 10 g/L y 20 g/L de xilosa respectivamente en medio rico YPX. Durante todo el proceso, se controló el pH en 6,0, la temperatura en 28 °C, la agitación en 600 rpm para el reactor 2A, y para el reactor 2B en 200 rpm. En la Tabla 2-11 se tabulan los parámetros cinéticos del crecimiento en los biorreactores.

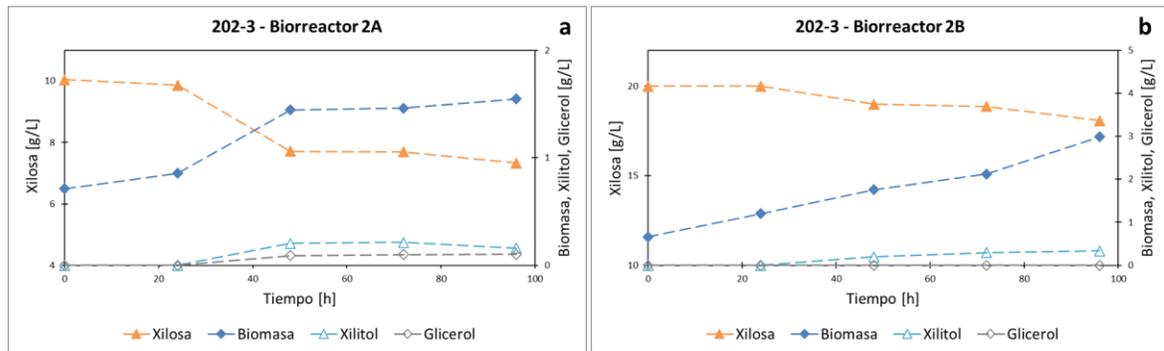


Figura 2-21 – Crecimiento de la cepa 202-3 en dos biorreactores. a) con 10 g/L y b) en medio completo YPX 20 g/L de xilosa.

Tabla 2-11 – Parámetros cinéticos de la cepa 202-3 en los biorreactores.

202-3	$Y_{x/s}$ [g/g]	$Y_{xil/s}$ [g/g]	P_x [g/l.h]	μ_{max} [h ⁻¹]
Bioreactor 4A	0,096±0,001	0,014±0,001	0,001±0,001	0,006±0,003
Bioreactor 2A	0,080±0,003	0,091±0,002	0,009±0,001	0,011±0,004
Bioreactor 2B	1,208±0,007	0,174±0,005	0,024±0,003	0,053±0,002

2.2.7 Amplificación de los genes involucrados en la metabolización de xilosa en la cepa 202-3

En la Figura 2-22 se presenta el gel con la amplificación de los genes involucrados en la metabolización de xilosa en la cepa 202-3 lo cual confirma que la levadura posee la maquinaria genética para la metabolización de xilosa.

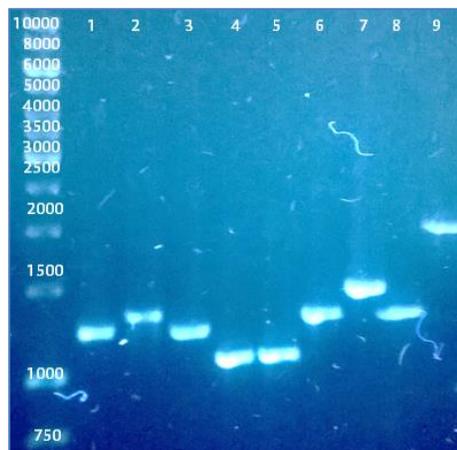


Figura 2-22 – Amplificación de los genes involucrados en la metabolización de xilosa en *S. cerevisiae* 202-3. Marcador de peso molecular 1kb; Pozo 1: *GCY1* 1255 pb; Pozo 2: *YPR1* 1342 pb; Pozo 3: *SOR2* 1215 pb; Pozo 4: *YDL124W* 1070 pb; Pozo 5: *GRE3* 1070 pb; Pozo 6: *YJR096W* 1313 pb; Pozo 7: *XYL2* 1486 pb; Pozo 8: *SOR1* 1309 pb; Pozo 9: *XKS1* 2112 pb.

En el trabajo de Wenger, Schwartz y Sherlock, 2010 se vinculó el fenotipo consumo positivo de xilosa de algunas cepas de vino a un locus único y dominante. Sus resultados señalaron una región en el cromosoma XV como responsable para este locus identificando un nuevo gen homólogo denominado *XDH1* presente en varias cepas de vino que pudo transferirse horizontalmente de una levadura no *S. cerevisiae* a las levaduras *S. cerevisiae* analizadas en este estudio. Teniendo en cuenta que la cepa 202-3 fue aislada de un ambiente natural de mieles de caña, en esta investigación se quiso analizar la posible presencia de este en la cepa 202-3. Como observado en la Figura 2-23, la cepa 202-3 no mostró amplificación de este gen denominado *XDH1*. Permitiendo concluir que su fenotipo positivo de consumo de xilosa está asociado a alguno de los otros genes involucrados a la metabolización de xilosa.

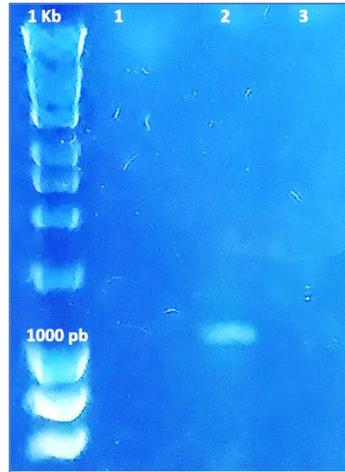


Figura 2-23 – Amplificación del gen *XDH1* en *S. cerevisiae* 202-3. Marcador de peso molecular 1 kb; Pozo 1: Sc 202-3, Pozo 2: Lavin EC1118 (control positivo), Pozo 3: Control negativo.

2.2.8 Determinación de ploidía de la levadura

Se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando los iniciadores descritos por (Huxley, Green y Dunham, 1990) para *MAT α* y *MAT α* usando el ADN de las cepas de levaduras CEN.PK2-1C, CEN.PK2-1D, CEN.PK2, 202-3, Q1 y 204-2. Se pudo concluir que la cepa 202-3 era diploide (Figura 2-24).

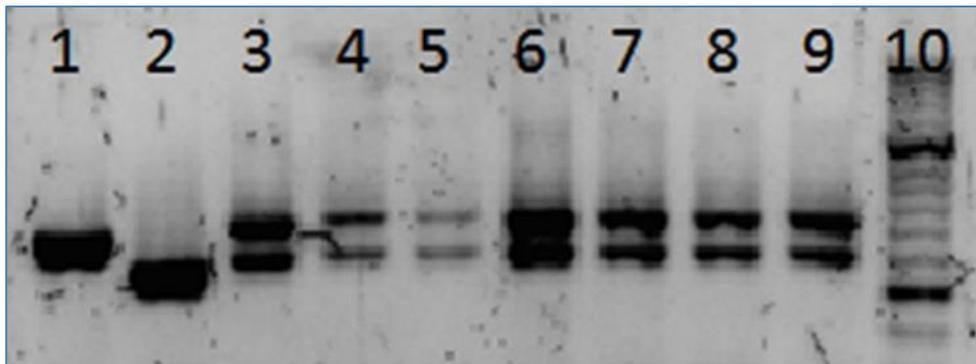


Figura 2-24 – Gel de electroforesis analizando la ploidía de las cepas de levaduras. 1: CEN.PK2-1C, 2: CEN.PK2-1D, 3: CEN.PK2, 4: Sc 202-3, 5: Q1, Pozo 6: 204-2, Pozo 7: Q1, 8: Q1, 9: Q1, 10: Marcador de peso molecular 1 Kb.

Conocida la ploidía de la cepa 202-3 a través de la amplificación de los genes *MAT* fue realizada citometría de flujo. El ciclo celular representa uno de los procesos fundamentales más importantes en las células eucariotas, permitiendo el crecimiento celular y la división de dos células hijas. La Figura 2-25 muestra los resultados obtenidos del análisis de citometría de flujo realizado con el equipo Muse™ Cell Analyzer. Las cepas de levaduras

analizadas fueron: 202-3, CEN.PK-2, CEN.PK-1C y CEN.PK-1D. Las cepas CEN.PK-2 (diploide), CEN.PK-1C (haploide), CEN.PK-1D (haploide) fueron usadas como controles ya que su nivel de ploidía era conocido. En cada parte de la Figura 2-25 (a, b, c y d), se muestra a la izquierda el índice de contenido de ADN vs el índice de tamaño celular para cada una de las cepas analizadas. A la derecha de cada parte, se muestra el histograma de la distribución de las fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M). De los resultados de la citometría de flujo se puede observar que la cepa 202-3 es similar a la cepa diploide CEN.PK-2 (a y b) pero diferente a la población de células de las cepas haploides CEN.PK-1C y CEN.PK-1D (c y d), lo cual permite inferir que la cepa 202-3 es diploide pues los porcentajes de células en cada fase y las distribuciones del ciclo celular son similares (% Gated).

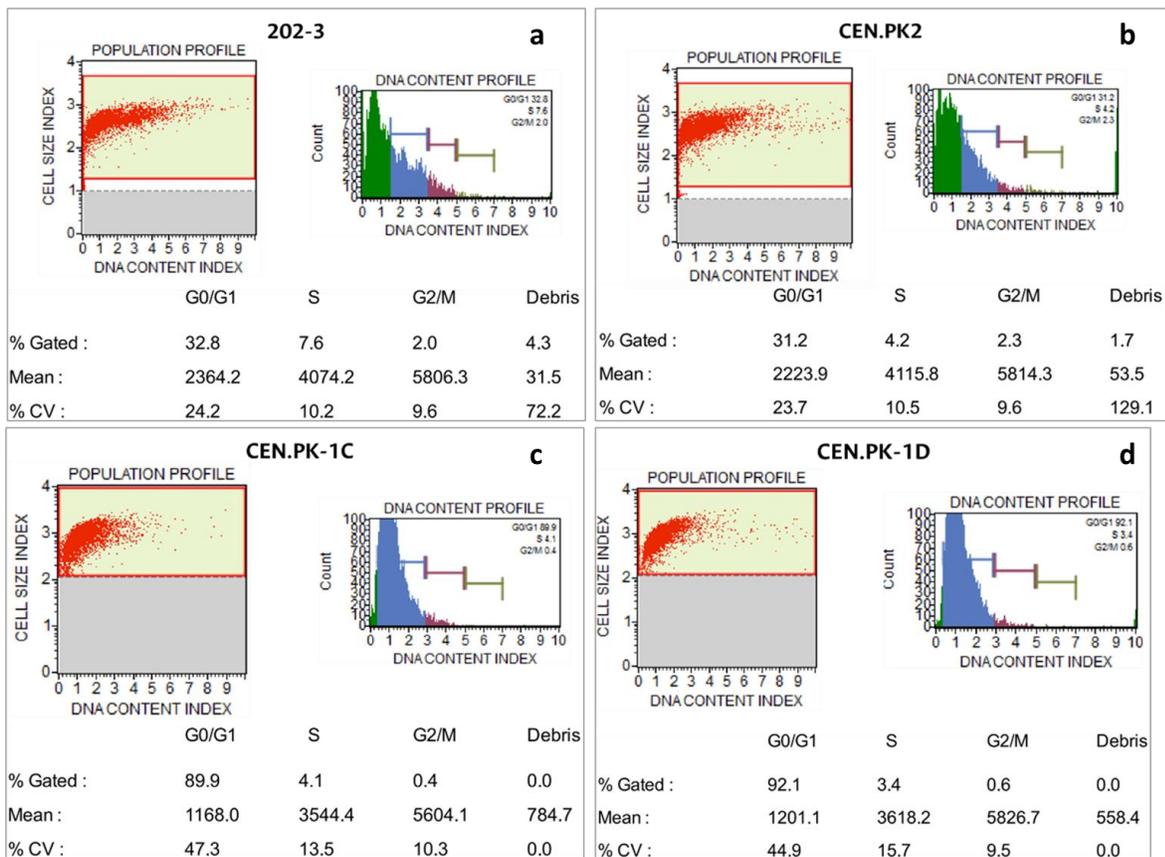


Figura 2-25 – Resultados citometría de flujo. a) cepa 202-3, b) cepa CEN.PK2, c) cepa CEN.PK-1C y d) cepa CEN.PK-1D.

Con estos resultados se logró confirmar la ploidía de la levadura y por lo tanto establecer que para el silenciamiento de un gen de interés en esta cepa se requiere eliminar dos copias de este.

2.2.9 Conclusiones

- La cepa de levadura 202-3 aislada en Colombia pertenece a la especie *S. cerevisiae*. Esto fue confirmado usando iniciadores específicos para la identificación de especie y por secuenciación de la región ITS, que por medio de un análisis de la secuencia consenso mostró más del 99% de similitud de esta región con otras *S. cerevisiae* reportadas.
- El aislado natural de *S. cerevisiae* 202-3 presenta una capacidad innata de metabolizar el azúcar xilosa y de producir xilitol. Esto se pudo corroborar por medio de diferentes ensayos en los cuales la única fuente de carbono fue este azúcar con un consumo relativamente lento e incompleto. También se verificó la presencia de los genes involucrados en la metabolización de la xilosa. No hubo amplificación del gen *XDH1* encontrado en levaduras con fenotipo positivo para xilosa, por lo cual se sugiere que su fenotipo frente a esta fuente de carbono puede estar relacionado con la expresión de sus genes endógenos.
- La condición microaerobia en los diferentes ensayos realizados con xilosa como fuente de carbono favoreció la producción de xilitol en la cepa 202-3.

3. Silenciamiento del gen *GAL80*

S. cerevisiae es la plataforma preferida para realizar ingeniería microbiana, teniendo en cuenta que es un microorganismo robusto, simple de manipular genéticamente y capaz de permitir flujos elevados de carbono a través de las rutas metabólicas centrales (Zhang, Rodriguez y Keasling, 2011).

Usando ingeniería genética de levaduras se silenció el gen *GAL80* en la cepa 202-3. La región genómica de interés presente en el genoma de la cepa fue modificada por medio recombinación homóloga usando metodologías basadas en PCR (PETRACEK y LONGTINE 2002).

En este capítulo se describen las metodologías usadas y los resultados obtenidos para alcanzar los objetivos específicos propuestos para determinar el efecto del silenciamiento del gen *GAL80* en la metabolización de xilosa en la cepa *Saccharomyces cerevisiae* 202-3, y para determinar los parámetros fermentativos para las cepas recombinantes obtenidas usando xilosa como fuente de carbono.

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Microorganismos, plásmidos y medios de cultivo

Para el silenciamiento génico de *GAL80* se utilizó la cepa de estudio 202-3 depositada en el Banco de Cepas y Genes del Instituto de Biotecnología con el código IBUN 090-03602 bajo la certificación IB-159-17. En la construcción de los módulos de silenciamiento fueron usados los plásmidos descritos en la Tabla 3-1, donados gentilmente por el Dr. Johannes Hegemann de la Universität Düsseldorf para fines de investigación. La conservación de plásmidos fue realizada en la bacteria *Escherichia coli* DH5 α .

Tabla 3-1 – Plásmidos utilizados para la construcción de los módulos de silenciamiento.

Plásmido	Descripción	Fuente
pUG6	<i>loxP</i> -PTEF-KanMX-TTEF- <i>loxP</i>	Güldener <i>et al.</i> , 1996
pUG66	<i>loxP</i> -PTEF-Ble ^r -TTEF- <i>loxP</i>	Gueldener <i>et al.</i> , 2002

En la selección de las cepas recombinantes fueron utilizados antibióticos (p. e. Geneticina 200 mg/L, (G418 – Sigma) y Pleomicina 20 µg/mL para levaduras (P9524 Sigma). Estos antibióticos se esterilizaron por filtración utilizando filtros estériles de 0,2 µm, Se obtuvieron las cepas recombinantes R1-MAPL, R2-MAPL y B2G-MAPL.

3.1.2 Preparación de células competentes bacterianas

Una colonia de la bacteria DH5α de *E. coli* es inoculada en medio LB durante la noche hasta saturación. Al otro día cuando las bacterias están crecidas, 1 mL del pré-inóculo es transferido para 100 mL de medio LB e incubado a 37 °C con agitación hasta alcanzar una absorbancia de 0,6 a 600 nm. El cultivo de las bacterias se transfiere para tubos de 50 mL, se deja en hielo 10 min y se centrifuga 10 min a 4000 rpm. El sobrenadante es descartado y se resuspende el precipitado en 10 mL de solución de calcio (Ca) a 0 °C (CaCl₂ 60 mM, glicerol 15%, PIPES 10 mM, pH 7,0). La suspensión se deja 30 min en hielo, Después de ese tiempo se centrifuga a 4000 rpm durante 10 min, se retira el sobrenadante y se realiza un nuevo lavado con la solución de Ca. El precipitado se resuspende en 2 mL de solución de Ca y se mantiene 15 minutos en el hielo, Se realizan alícuotas de 80 µL en tubos de 1,5 mL estériles y son almacenadas a -80°C hasta su uso (Ausubel *et al.*, 1992; Sambrook y Russell 2001). Las células competentes permiten insertar plásmidos de interés en bacterias por medio de transformaciones con el fin de obtener mayor cantidad de estos.

3.1.3 Transformación de bacterias

Son adicionados de 1-5 µL (aproximadamente 50 ng) de plásmido de interés a cada alícuota de las células competentes DH5α siguiendo el procedimiento de (Sambrook y Russell, 2001). Se mantienen en hielo por 10 min y son incubadas en baño de María a 42 °C durante 2 min. Las células son colocadas en hielo por 1 min y después son adicionados 500 µl de medio LB. Las células son incubadas por 1 hora a 37 °C con agitación. Después las células son centrifugadas y resuspendidas en 200 µL de LB. La suspensión es plaqueada en medio sólido con el antibiótico de selección e incubada a 37 °C por 24 – 48 horas como descrito en (Ausubel *et al.*, 1992).

3.1.4 Extracción de ADN plasmídico de bacterias

La técnica de *Miniprep* es utilizada para la extracción de plásmidos (Maniatis, Fritsch y Sambrook, 1982). Una colonia de las transformantes es inoculada en medio LB con el antibiótico de selección e incubada durante la noche a 37 °C con agitación. Son transferidos 1,5 mL del cultivo a un microtubo, el cual es centrifugado por 3 min a 6000 rpm, el sobrenadante es descartado y el *pellet* resuspendido en 100 µL de GTE (50 mM de glucosa, 10 mM de EDTA y *buffer* 25 mM Tris-HCl, pH 8,0). Después es adicionado 1 µL de la enzima (*RNAse Ribonuclease*) a una concentración de 1 mg/µL, se mezcla invirtiendo el tubo y se deja 5 min a temperatura ambiente. Después, se adicionan 200 µL de solución de NaOH/SDS (0,2 M de NaOH y 1% de SDS), se mezcla y se incuba en hielo por 5 min. Después se adicionan 150 µL de solución de acetato de potasio 5 M con un pH de 4,8 y se deja en hielo por 5 min y se agita. Se centrifuga a 9000 rpm por 5 min. Se transfieren a un tubo 400 µL del sobrenadante, se adicionan 800 µL de etanol a una concentración de 95 % y se dejan a -20 °C por 30 min. El tubo es centrifugado 15 min a 12000 rpm y el sobrenadante es descartado. El precipitado es lavado con 1 mL de etanol a una concentración de 70 %, nuevamente se centrifuga por 5 min a 12000 rpm y el sobrenadante es descartado. El tubo con el *pellet* es secado en la cabina de flujo laminar en condiciones estériles y el ADN resuspendido en 40 µL de agua ultrapura estéril.

3.1.5 Diseño de iniciadores para el silenciamiento de *GAL80*

La secuencia del gen *GAL80* se obtuvo de la base de datos de Saccharomyces Genome Database (SGD, 2018), particularmente en Gene/Sequence Resources, después fue seleccionado el archivo fasta de la secuencia codificante.

El gen *GAL80/YML051W* tiene un tamaño de 1308 pb, se encuentra en el cromosoma XIII en las coordenadas 171594 a 172901 (Figura 3-1).

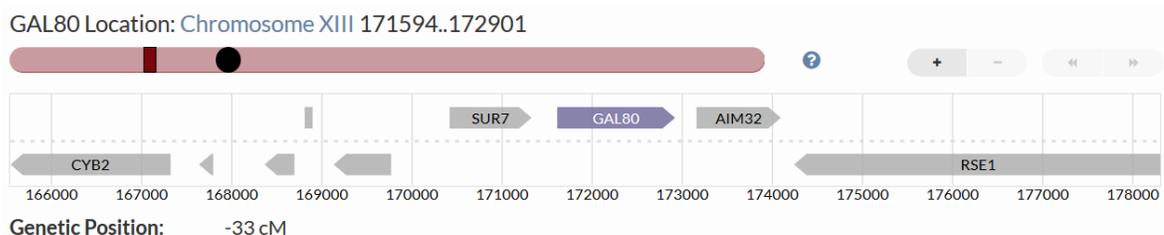


Figura 3-1 – Ubicación del gen *GAL80* en el cromosoma XIII de la levadura *S. cerevisiae*. Obtenida de SGD, 2017.

Secuencia del gen *GAL80*

YML051W Chr 13

```

ATGGACTACAACAAGAGATCTTCGGTCTCAACCGTGCCTAATGCAGCTCCCATAAGAGTC
GGATTCGTCGGTCTCAACGCAGCCAAAGGATGGGCAATCAAGACACATTACCCCGCCATA
CTGCAACTATCGTCACAATTTCAAATCACTGCCTTATACAGTCCAAAAATTGAGACTTCT
ATTGCCACCATTAGCGTCTAAAATTGAGTAATGCCACTGCTTTTCCCACCTTAGAGTCA
TTTGCATCATCTTCCACTATAGATATGATAGTGATAGCTATCCAAGTGGCCAGCCATTAT
GAAGTTGTTATGCCTCTCTTGGAAATCTCCAAAAATAATCCGAACCTCAAGTATCTTTTC
GTAGAATGGGCCCTTGATGTTCACTAGATCAAGCCGAATCCATTATAAGGCTGCTGCT
GAACGTGGGGTTCAAACCATCATCTCTTTACAAGGTCGTAAATCACCATATATTTTGAGA
GCAAAAGAATTAATATCTCAAGGCTATATCGGCGACATTAATTCGATCGAGATTGCTGGA
AATGGCGGTTGGTACGGCTACGAAAGGCCTGTTAAATCACCAAAATACATCTATGAAATC
GGGAACGGTGTAGATCTGGTAACCACAACATTTGGTCACACAATCGATATTTTACAATAC
ATGACAAGTTCGTACTTTTCCAGGATAAATGCAATGGTTTTTCAATAATTTCCAGAGCAA
GAGCTGATAGATGAGCGTGGTAACCGATTGGGCCAGCGAGTCCCAAAGACAGTACCGGAT
CATCTTTTATTCGAAGGCACATTGTTAAATGGCAATGTTCCAGTGTATGCAGTTTCAA
GGTGGCAAACCTACCAAAAAATTTACCAAAAAATTTGGTCATTGACATTCACGGTACCAAG
GGAGATTTGAAACTTGAAGGCGATGCCGGCTTCGCAGAAATTTCAAATCTGGTCTTTTAC
TACAGTGGAACTAGAGCAAACGACTTCCCGCTAGCCAATGGACAACAAGCTCCTTTAGAC
CCGGGTATGATGACGGTAAAGAAATCATGGAAGTATATCATTACGAAATTATAATGCC
ATTGTGGGTAATATTCATCGACTGATCAATCTATCTGACTTCCACTTCAATACAAAG
AAAAATCCTGAATTACCCTACAATTTGTAATGCAAGGTTTCGATTTTGAAGGCTTTCCC
ACCTTGATGGATGCTCTGATATTACACAGGTTAATCGAGAGCGTTATAAAAGTAACATG
ATGGGCTCCACATTAACGTTAGCAATATCTCGCATTATAGTTATAA

```

Para el diseño de los iniciadores de los módulos de silenciamiento es necesario incluir 19-22 nt de homología al plásmido que tiene el marcador *loxP*, complementarios a las secuencias 3', y 45 nt de homología al gen de interés complementarios a las secuencias 5'. Se realizó el diseño de 2 pares de iniciadores para la construcción del denominado módulo de delección externa. Estos iniciadores deben ser diseñados a 400-500 pb aproximadamente antes del codón de inicio y después del codón de terminación del gen, teniendo en cuenta no afectar la región codificante de los genes que están antes y después del *GAL80*. En el diseño de los iniciadores se tuvo en cuenta la localización en el cromosoma XIII del gen *SUR7* 170402 a 171310, y del gen *AIM32* localizado en la posición 173139 a 174074 del cromosoma. Teniendo en cuenta esas indicaciones se escogió la secuencia para el diseño de los iniciadores que no afectara los genes aledaños. Para el diseño de estos iniciadores se usó el programa "BLAST primer" y se escogió el par de iniciadores que presentaba las mejores características en cuanto a diferencia de temperatura de alineamiento entre ellos y complementariedad entre otras características. Esto último también fue aplicado para la selección de todos los iniciadores diseñados tanto para la obtención de los módulos de silenciamiento como para las diferentes verificaciones.

Los iniciadores usados en la construcción del módulo de delección interna fueron diseñados teniendo en cuenta la secuencia inmediatamente anterior al codón de inicio del gen *GAL80* y al final del codón de parada. Los iniciadores seleccionados para la construcción de los módulos presentan 45 nt de homología al gen *GAL80* y 19-22 nt con homología a *loxP*.

Para la verificación de la correcta inserción de los módulos y del silenciamiento del gen *GAL80* en las recombinantes obtenidas se diseñaron diferentes conjuntos de iniciadores. Los llamados como de “verificación lejos” fueron diseñados a aproximadamente 300 pb *upstream* y 300 pb *downstream* de la región de integración del módulo en el genoma, con los cuales se obtiene un fragmento mayor a 2000 pb. El par de iniciadores llamados como de “verificación dentro” fueron diseñados teniendo en cuenta la secuencia codificante del gen, con los cuales se obtuvo un fragmento de 458 pb. Los demás iniciadores permiten la verificación de la inserción correcta del módulo de silenciamiento como en el caso del V-BLE-F forward y V-KAN-R reverse. Haciendo las diferentes combinaciones de los iniciadores se verificó el silenciamiento del gen *GAL80* en las recombinantes obtenidas. Para verificar el diseño adecuado de los iniciadores se utilizó el programa Serial Cloner con el cual se realizaron *PCRs* sintéticas para evaluar los tamaños esperados de los fragmentos en la amplificación.

Los iniciadores seleccionados se encuentran en la Tabla 3-2 a continuación. Los nucleótidos subrayados en negrita en los iniciadores denominados: F-GAL80-EXT-MAPL, R-GAL80-EXT-MAPL, F-INT-GAL80-MAPL, R-INT-GAL80-MAPL son los que tienen homología al plásmido que tiene el marcador *loxP*.

Tabla 3-2 – Secuencia de iniciadores para las estrategias de silenciamiento del gen *GAL80* en la cepa *S. cerevisiae* 202-3.

Iniciador	Secuencia 5'-3'
F-GAL80-EXT-MAPL	TATCACTGCTGGTCTTGCCGACCAGCGTATACAATCTCGATAGT CAGCTGAAGCTTCGTACGC
R-GAL80-EXT-MAPL	CAGTATTCGTTTTTATAACGTTTCGCTGCACTGGGGGCCAAGCACAG CATAGGCCACTAGTGGATCTG
F-INT-GAL80-MAPL	TCATGGACTACAACAAGAGATCTTCGGTCTCAACCGTGCCTAAT GCAGCTGAAGCTTCGTACGC
R-INT-GAL80-MAPL	GCGAGATATTGCTAACGTTTAAATGTGGAGCCCATCATGTTACTTT GCATAGGCCACTAGTGGATCTG
F-VERIF. DENTRO GAL80	CAGCGAGTCCCAAGACAGT
R-VERIF. DENTRO GAL80	TCCATCAAGGTGGGAAAGCC
F-VER. LEJOSA GAL80-A	ATTGACTGCCACTGGACCTG

Iniciador	Secuencia 5'-3'
R-VER. LEJOSD GAL80-D	CCACCTAAATGGGAGCGCAA
V-BLE-F	CCTTCTATGAAAGGTTGG
V-KAN-R	GGAATCGAATGCAACCGG
BM-BLE	GGATGTATGGGCTAAATG
CM-BLE	CCTCGACATCATCTGCC

3.1.6 PCR para generar el casete de disrupción

En la Reacción en Cadena de la Polimerasa realizada para la obtención de los casetes de disrupción se utilizó la enzima de alta fidelidad Q5: Polimerasa de alta fidelidad: Q5® *High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs), 10X PCR buffer: 750 mM Tris-HCl, pH 9,0, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% (w/v) Tween 20. En la Tabla 3-3 se describen los componentes para una reacción de 25 µL y en la Tabla 3-4 las condiciones para la reacción en el termociclador.

Tabla 3-3 – Mezcla de reacción de PCR para la obtención de casetes de silenciamiento gen *GAL80* (NEB 2017).

Componente	Reacción de 25 µL	Concentración final	Reacciones 13x (25 µL)
5X Q5 reaction buffer	5 µL	1X	65 µL
5X Q5 High GC Enhancer	5 µL	1 X	65 µL
10 mM dNTP's	0,5 µL	200 µM	6,5 µL
10 µM Forward Primer (<i>GAL80</i>)	1,25 µL	0,5 µM	16,25 µL
10 µM Reverse Primer (<i>GAL80</i>)	1,25 µL	0,5 µM	16,25 µL
Agua ultrapura	11,25 µL		146,25 µL
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,25 µL	0,02 U/ µL	0,25 µL x reacción
DNA (plásmido pUG6 o pUG66)	Variable	<1000 ng	≈0,5 µL/reacción

Tabla 3-4 – Condiciones PCR para generación casete silenciamiento *GAL80*.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	98 °C	1:30 minutos
Desnaturalización	98 °C	20 segundos
Alineamiento	70 °C	35 segundos
Extensión	72 °C	0:55 segundos
Extensión final	72 °C	8 minutos
Almacenamiento	4 °C	Indefinido

3.1.7 Electroforesis en gel de agarosa

Conforme a lo descrito en el capítulo 2.

3.1.8 Purificación del ADN del gel de agarosa

Las bandas de los fragmentos de interés fueron cortadas para purificación del ADN usando el kit Ilustra GFX PCR DNA and *Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), teniendo en cuenta las indicaciones del fabricante.

3.1.9 Preparación de células competentes de levaduras

Las levaduras son inoculadas en 5 mL de medio líquido (SC o YPD) e incubadas toda la noche a 28 °C sobre agitación orbital a 160 rpm. En el siguiente día se determina el crecimiento de la levadura a través de la absorbancia a 600 nm y se inicia un inóculo a una absorbancia de ~0,1 en 50 mL de medio. Ese inóculo se deja creciendo hasta alcanzar una absorbancia de 1,0. Una vez alcanzado este valor de absorbancia el cultivo se transfiere para un tubo de 50 mL, se centrifuga a 3000 rpm durante 5 min y se descarta el sobrenadante. Después las células son lavadas con agua destilada y nuevamente centrifugadas. Finalmente, las células son resuspendidas en 1 mL de 0,1 M de acetato de litio y se transfieren para un tubo estéril. El tubo es centrifugado a 4000 rpm durante 2 min y se descarta el sobrenadante. Se adiciona un volumen de acetato de litio 0,1 M a las células dependiendo del valor de absorbancia presentado. Se realizan alícuotas de 100 µL, se centrifugan a 13000 rpm a temperatura ambiente y el sobrenadante es removido de acuerdo con los métodos descritos en la literatura (Ito *et al.*, 1983; Gietz *et al.*, 1992; Gietz y Woods, 2002).

3.1.10 Extracción de ADN genómico de levaduras

Como descrito en el capítulo 2 (Anexo E).

3.1.11 Transformación de las levaduras

La transformación de las levaduras fue realizada de acuerdo con los métodos descritos en la literatura (Ito *et al.*, 2010; Gietz *et al.*, 1992; Gietz y Woods, 2002; Gueldener *et al.*, 2002; Güldener *et al.*, 1996). Las células previamente crecidas durante la noche anterior son resuspendidas en 50 mL de YPD para un nuevo inóculo. Se inicia con una absorbancia de

0,2 a 600 nm y se crecen hasta alcanzar una absorbancia de 0,7-1,0. Después son centrifugadas a 4000 rpm durante 5 min y resuspendidas en 10 mL de agua ultrapura. Las células nuevamente se centrifugan y se resuspenden en 1 mL de agua, luego se transfieren a un tubo de plástico estéril de 1,5 mL. Nuevamente, las células son centrifugadas a 5000 rpm por 1 min y resuspendidas en 1,5 mL de solución estéril de TE/LiOAc (10X TE=0,1 M Tris-HCl, 0,01 M EDTA, pH 7,5; 10 X LiOAc= 1M LiOAc pH 7,5). De nuevo, se centrifugan las células y se resuspenden en 200 µl de TE/LiOAc, Para el silenciamiento génico se mezclan: ~5 µg ADN del módulo de silenciamiento, 50 µg de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, 50 µl de células en TE/LiOAc y 300 µl de PEG 4000 al 40 %. Después de incubar las células a 42 °C durante 30 min, son centrifugadas a 13000 rpm durante 10 s y resuspendidas en 1 mL de YPD. Posteriormente son incubadas de 3-5 horas a 30 °C. Transcurrido el tiempo las células son centrifugadas y resuspendidas en 200 µl de YPD y plaqueadas con asa de Drigalsky en medio YPD con el antibiótico de selección. Las placas se incuban finalmente a 30 °C hasta que aparezcan colonias (ver Anexo K). Una vez obtenidas transformantes, fueron seleccionadas de 10 - 20 colonias para evaluación.

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Obtención de transformantes bacterianas con los plásmidos que se usarán en los módulos de silenciamiento de genes

Para la obtención de módulos de silenciamiento de genes es necesario tener una cantidad considerable de ADN de los plásmidos que serán utilizados para dichos módulos. Por esa razón se realizaron las metodologías de obtención de células competentes y transformación bacteriana utilizando los plásmidos pUG6 y pUG66 con los que se obtuvieron transformantes de forma exitosa. A partir de las transformantes se pudo obtener ADN puro de los plásmidos (Tabla 3-5) y se inició la obtención de los módulos para alcanzar el silenciamiento completo del gen *GAL80*.

Tabla 3-5 – Resultados extracción de ADN de los plásmidos pUG6 y pUG66.

Plásmido	pUG6 ¹	pUG6 ²	pUG6 ³	pUG6 ⁴	pUG66 ¹	pUG66 ²	pUG66 ³	pUG66 ⁴
Concentración [ng/µl]	829,3	341,5	759	415,2	871,3	452,9	4164,9	282
A 260/280	1,94	1,91	1,95	1,94	2,09	2,04	2,08	1,94
A 260/230	2,42	2,30	2,12	1,83	2,48	2,28	2,22	2,44

3.2.2 Obtención de módulos de silenciamiento

Los genes que codifican las enzimas requeridas para el metabolismo de la galactosa en *S. cerevisiae* son controlados a nivel de la transcripción por un interruptor genético que consiste en tres proteínas: un activador transcripcional Gal4; un represor transcripcional Gal80; y un sensor de ligando Gal3 (Timson, Ross y Reece, 2002). Gal80 es un regulador de la transcripción implicado en la represión de los genes *GAL* en ausencia de galactosa. Silenciar el gen *GAL80* para que los genes *GAL* pasen a ser expresos de forma continua podría mejorar la fermentación en pentosas como la xilosa.

El gen *GAL80* se encuentra localizado en el cromosoma XIII del genoma de la levadura *S. cerevisiae* (SGD 2017). Con el silenciamiento de este gen en la cepa de levadura *S. cerevisiae* 202-3 se estima que el consumo de xilosa por la levadura aumentará permitiendo una mejor captación del azúcar por la posible sobreexpresión de *GAL2*. Por otro lado, el silenciamiento del gen *GAL80* podría también permitir la expresión del gen *GCY1* debido a que este gen también está regulado por el factor de transcripción *GAL4*.

Gal4 es un factor de transcripción de unión al ADN requerido para la activación de los genes *GAL* en respuesta a la galactosa (Matsushika, Goshima y Hoshino, 2014). Esta proteína de 881 aminoácidos tiene un dominio de unión al ADN tipo *cluster* Zn-Cys binuclear, un dominio *linker*, un dominio de dimerización y dos dominios ácidos de activación (IRA y ARII) (Lohr, 1997).

Gal4 media la expresión de la mayoría de los genes implicados en la utilización de galactosa, una fuente de carbono de asimilación pobre que se utiliza sólo si la glucosa y otras fuentes no están disponibles. La galactosa induce la expresión de los genes regulados por Gal4, que incluyen los genes de utilización de galactosa *GAL1*, *GAL2*, *GAL3*, *GAL7*, *GAL10* y *GAL80*, así como *GCY1*, *LAP3*, *MTH1*, *PCL10*, *REE1* y *FUR4* (Ren *et al.*, 2000). La activación por Gal4 ocurre en la región C-terminal que estimula la transcripción y la unión a Gal80 (Ma y Ptashne 1987). Gal4 puede inducir la expresión del gen *GCY1* que codifica para una glicerol deshidrogenasa (Ahmad, Shim y Kim, 2012) con actividad xilosa reductasa, la cual puede estar participando en la conversión de xilosa a xilitol en la cepa 202-3. *GCY1/YOR120W* codifica para una enzima glicerol deshidrogenasa involucrada en una ruta alternativa para el catabolismo de glicerol. *GCY1/YOR120W* pertenece a la familia de las aldoceto reductasas.

Dado que la cepa 202-3 es diploide, dos copias del gen *GAL80* fueron silenciadas una por cada cromosoma XIII. La Figura 3-2 muestra un esquema de la construcción de 2 módulos de silenciamiento, uno de ellos utilizando el plásmido pUG6 y el otro utilizando el plásmido pUG66 descritos por (Güldener *et al.*, 1996; Gueldener *et al.*, 2002). Esta metodología se usó para la obtención de los módulos de silenciamiento mencionados.

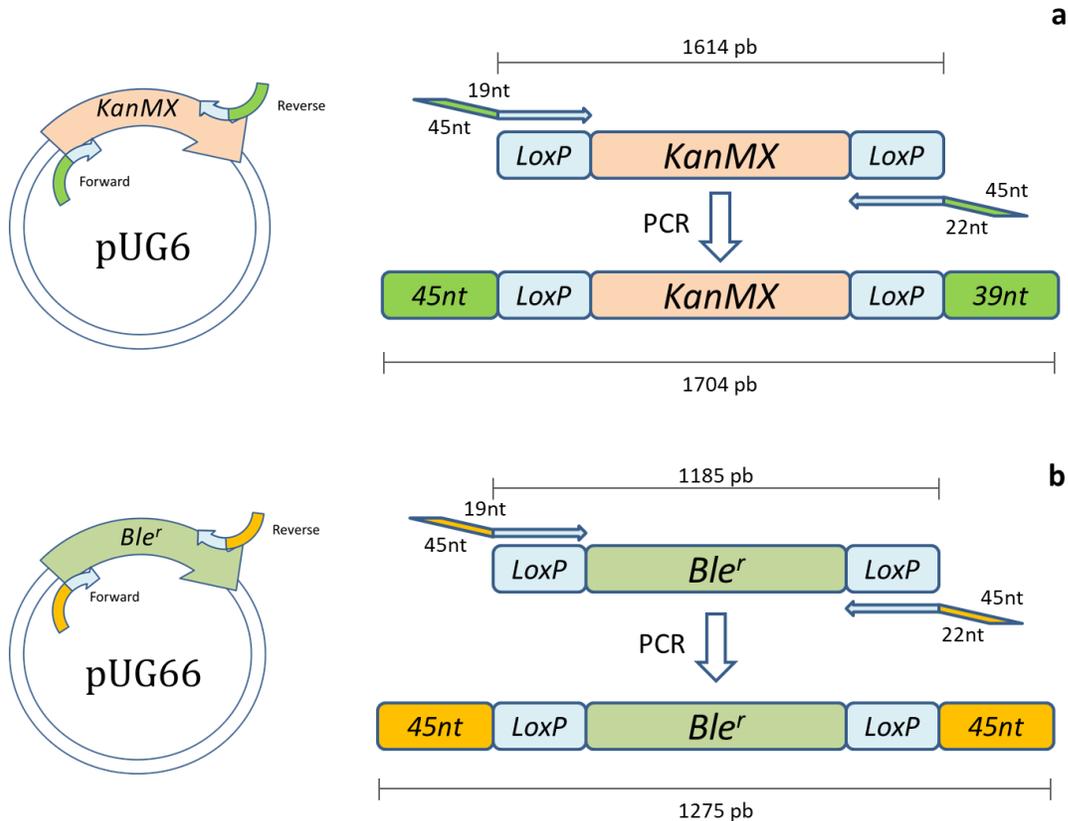


Figura 3-2 – Estrategia construcción módulos de silenciamiento gen *GAL80* (Patiño, 2015). a) Módulo de silenciamiento usando el marcador *KanMX* (1704 pb) y b) Módulo de silenciamiento usando el marcador *Ble^r* (1275 pb). Los iniciadores utilizados poseen una región de homología (19-22 nt) a los plásmidos pUG6 y pUG66 y una región de homología al genoma de la levadura (45 nt). En el denominado módulo de delección externa la región de homología se encuentra en la región externa del gen *GAL80* y en el denominado módulo de delección interna esta región de homología se encuentra inmediatamente antes del codón de inicio y del codón de terminación del gen.

La imagen del gel de electroforesis con la amplificación correcta de los módulos de silenciamiento para el gen *GAL80* se presenta en la Figura 3-3. Los pozos 1, 2, 3 y 4 de la imagen representan el resultado de la amplificación del módulo de delección usando el

marcador *Ble^r* con un tamaño de 1275 pb. Los pozos 5, 6, 7 y 8 representan la amplificación para el módulo de silenciamiento usando el marcador *KanMX* con un tamaño de 1704 pb.

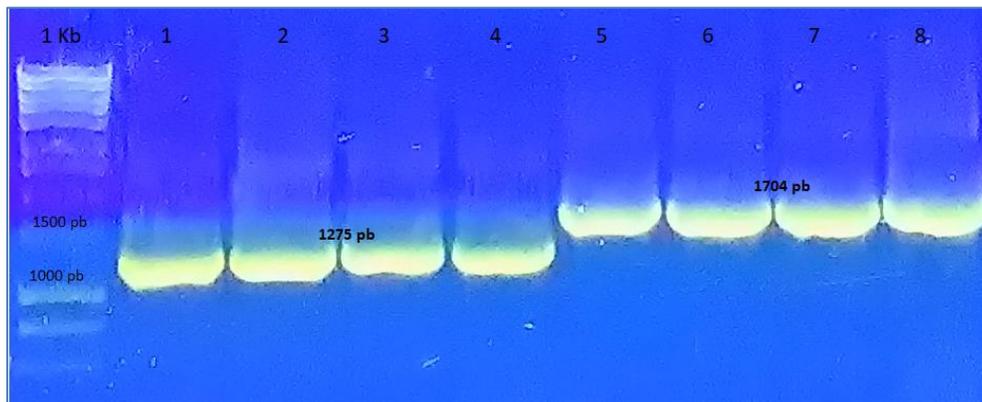


Figura 3-3 – Gel de electroforesis que confirma la construcción de los módulos de silenciamiento del gen *GAL80*, mostrando los pozos 1-4: módulo deleción con marcador de selección *Ble^r*; 5-8: módulo deleción con marcador de selección *KanMX*.

3.2.3 Obtención de recombinantes

Una vez obtenidos los módulos de silenciamiento se realizó la purificación del fragmento de ADN. Posteriormente fueron realizados diferentes procesos de transformación en la cepa *S. cerevisiae* 202-3 usando los métodos de transformación química (Schiestl y Gietz, 1989; Gietz y Woods, 2002; Gietz *et al.*, 1992; Gietz y Schiestl, 2007) y por electroporación descrito por (Thompson y colaboradores en 1998).

Dado que la cepa 202-3 es diploide, para el silenciamiento completo del gen *GAL80* se necesitaba silenciar dos copias del gen, razón por la cual se construyeron dos módulos de silenciamiento denominados módulo de deleción externa y módulo de deleción interna. Cada módulo cuenta con un gen marcador que confiere resistencia a un antibiótico. El gen *KanMX* presente en el plásmido pUG6 (Güldener *et al.*, 1996; Gueldener *et al.*, 2002) confiere resistencia al antibiótico Geneticina. El gen *Ble^r* presente en el plásmido pUG66 (Güldener *et al.*, 1996; Gueldener *et al.*, 2002) confiere resistencia a los antibióticos Pleomicina y Zeocina.

3.2.4 Verificación de recombinantes

A continuación, se describen los procesos de verificación realizados para confirmar el silenciamiento del gen *GAL80* en las recombinantes obtenidas. Las imágenes que se

muestran en cada verificación a continuación son representativas de los tamaños de fragmentos obtenidos. En la parte superior de cada figura a continuación (parte a) se encuentra una descripción del tamaño esperado de la amplificación y la ubicación de los iniciadores de verificación utilizados en cada caso con flechas. Estas verificaciones fueron realizadas con los iniciadores diseñados para esta finalidad descritos anteriormente en la Tabla 3-2. Inicialmente se realizaron dos procesos de transformación por separado; en uno de ellos se realizó la inserción del módulo de silenciamiento con el marcador de selección *KanMX* en la cepa 202-3 y en el otro se insertó el módulo de silenciamiento con el marcador de selección *Ble^r*. Los pozos 2 y 3 de la Figura 3-4 hacen referencia a la amplificación del fragmento esperado para las recombinantes que presentan resistencia al antibiótico Geneticina. En los pozos 5-8 se observa la amplificación del fragmento esperado para las recombinantes con resistencia al antibiótico Pleomicina. La amplificación de ambos fragmentos mostró el tamaño esperado para cada uno, mayor a 2000 pb. Los iniciadores utilizados fueron los denominados: F-VER. LEJOS *GAL80*-A y R-VER. LEJOS *GAL80*-D, descritos en la Tabla 3-2.

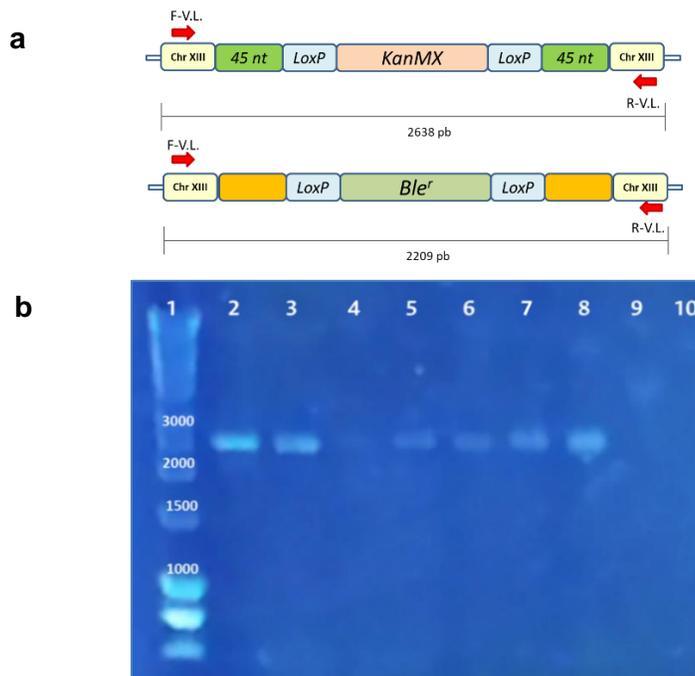


Figura 3-4 – Verificación de recombinantes usando iniciadores de verificación lejos, a) módulos de silenciamiento, b) electroforesis con los pozos 1: marcador de peso molecular; 2-3: transformantes módulo *KanMX*; 5-8: Transformantes módulo *Ble^r*; 9-10: Control negativo.

Posteriormente se seleccionaron 2 recombinantes con la presencia del módulo de silenciamiento *KanMX* denominadas R1-MAPL y R2-MAPL (Tabla 3-6) para analizar el silenciamiento génico de *GAL80*.

Tabla 3-6 – Descripción recombinantes obtenidas con módulo *KanMX*.

Cepa	Genotipo o descripción	Fuente o referencia
R1-MAPL	202-3, <i>GAL80/gal80Δ::KanMX</i>	Este trabajo
R2-MAPL	202-3, <i>GAL80/gal80Δ::KanMX</i>	Este trabajo

En la Figura 3-5 se muestra por medio de la imagen de electroforesis la verificación de las recombinantes R1-MAPL y R2-MAPL con resistencia a Geneticina usando los iniciadores de verificación (Tabla 3-2) para la comprobación de la inserción correcta del gen *KanMX*. En ese mismo gel se realizó la verificación de la presencia del gen *GAL80* en las recombinantes con resistencia a geneticina, demostrando que a pesar de que la transformación fue exitosa aún quedaba una copia del gen *GAL80* por silenciar, dado que hubo amplificación del fragmento de 458 pb que representa la presencia de una copia del gen *GAL80*.

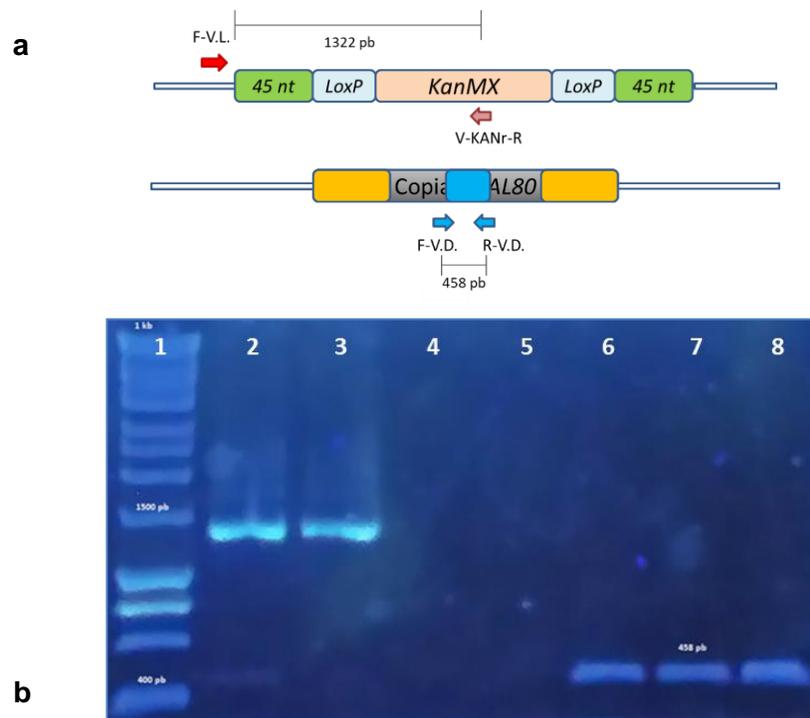


Figura 3-5 – Verificación de recombinantes. a) módulo de silenciamiento con ubicación de los *primers* de verificación indicados con flechas, b) electroforesis mostrando los pozos 1: Marcador de peso molecular; 2: R1-MAPL; 3: R2-MAPL, 4: Sc 202-3 ninguna amplificación; 5: Control negativo; 6: R1-MAPL; 7: R2-MAPL; 8: 202-3. La presencia de bandas en los pozos 6 y 7 confirman la presencia de una copia del gen *GAL80* en las recombinantes.

Las verificaciones mostradas permiten concluir que las cepas recombinantes R1-MAPL y R2-MAPL tienen inserto el módulo de silenciamiento con el marcador *KanMX* correctamente. Sin embargo, sólo una copia del gen *GAL80* fue silenciada. Por esta razón

se realizaron procesos de transformación adicionales con el módulo de silenciamiento que presenta el marcador *Ble^r* tanto con la recombinante R1-MAPL como con la recombinante R2-MAPL, buscando silenciar completamente el gen *GAL80* en la cepa 202-3. Estas recombinantes fueron seleccionadas porque de las evaluadas fueron las que presentaban la inserción correcta del módulo de selección con el marcador *KanMX*. Fueron realizadas otras verificaciones, pero la mostrada en la Figura 3-5 es la contundente para esta afirmación. Otros procesos de transformación adicionales fueron realizados usando las recombinantes R1-MAPL y R2-MAPL con la intención de silenciar la segunda copia del gen presente en el genoma de la cepa 202-3.

En estos procesos de transformación fueron obtenidas más de 30 recombinantes de las cuales se seleccionaron 13 de cada proceso para verificación de esta segunda transformación (13 para las recombinantes obtenidas de R1-MAPL y 13 para las obtenidas de la recombinante R2-MAPL). La Figura 3-6 y la Figura 3-7 muestran la amplificación obtenida en las recombinantes de *Ble^r* usando los iniciadores de verificación “LEJOS” F-VER. LEJOS A y de R-VER. LEJOS D de la Tabla 3-2.

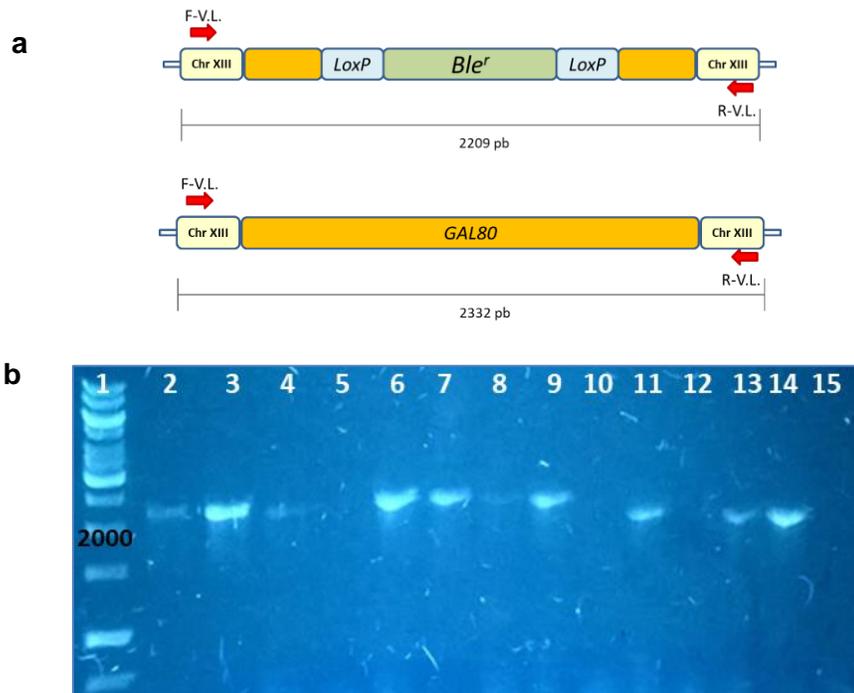


Figura 3-6 – Verificación de recombinantes del módulo *Ble^r* con iniciadores de verificación “LEJOS”, a) módulo de silenciamiento y ubicación del gen *GAL80*, b) Electroforesis mostrando los pozos 1: marcador de peso molecular; 2: B1; 3: B2; 4: B3; 5: B4; 6: B5; 7: B6; 8: B7; 9: B8; 10: B9; 11: B10; 12: B11; 13: B12; 14: S1; 15: Control negativo.

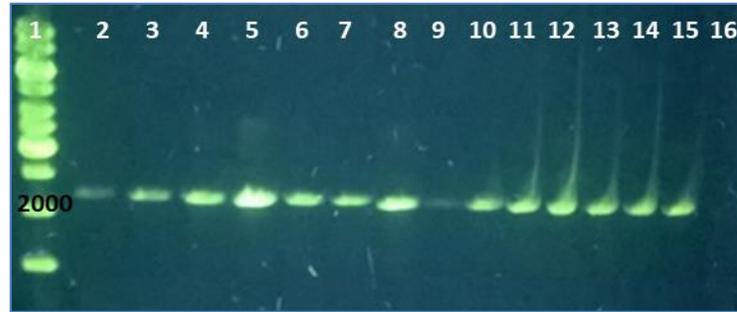


Figura 3-7 – Electroforesis de verificación de recombinantes con el módulo *Ble'* usando iniciadores de verificación “LEJOS” mostrando los pozos 1: marcador de peso molecular; 2: B1; 3: B2; 4: B3; 5: B4; 6: B5; 7: B6; 8: B7; 9: B8; 10: B9; 11: B10; 12: B11; 13: B12; 14: S1; 15: 202-3; 16: Control negativo.

La Figura 3-8 muestra la amplificación de la recombinante B2G-MAPL usando los iniciadores de verificación “LEJOS” (F-VER. LEJOS A y R-VER. LEJOS D de la Tabla 3-2), con los cuales se obtuvo un fragmento de 2209 pb para la inserción correcta del módulo, En el caso de la parental se obtuvo un fragmento de 2332 pb.



Figura 3-8 – Verificación de recombinantes con el módulo *Ble'* con iniciadores de verificación lejos, mostrando los pozos 1: marcador de peso molecular; 4: B1; 5: B2; 6: B3; 7: 202-3; 8: Control negativo.

La Figura 3-9, Figura 3-10 y Figura 3-11 muestran las principales verificaciones de la correcta inserción de módulo *Ble'*, con la obtención de la recombinante B2G-MAPL la cual presenta el gen *GAL80* silenciado.

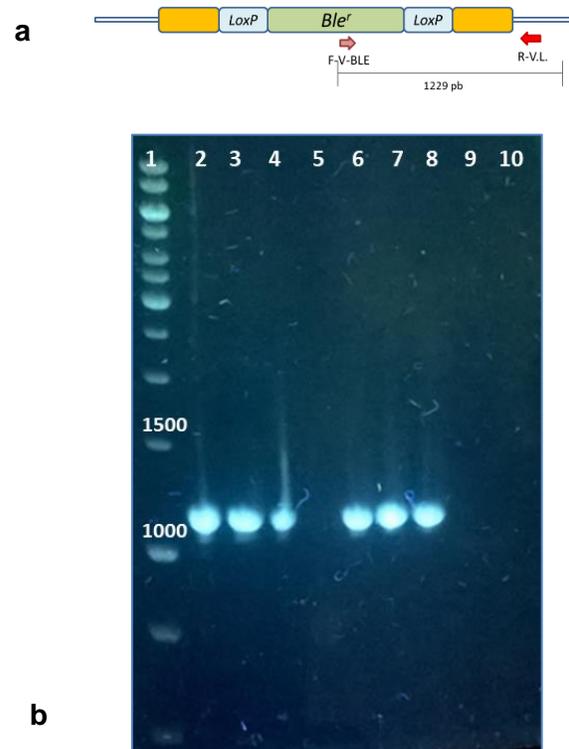


Figura 3-9 – Verificación de recombinantes con el módulo *Ble^r* con iniciadores F-BLE y R-VER. LEJOS, a) módulo de silenciamiento, b) electroforesis mostrando los pozos 1: marcador de peso molecular; 2: B8; 3: B2; 4: B5; 5: Control negativo; 6: B8; 7: B2; 8: B5; 9: 202-3; 10: Control negativo.

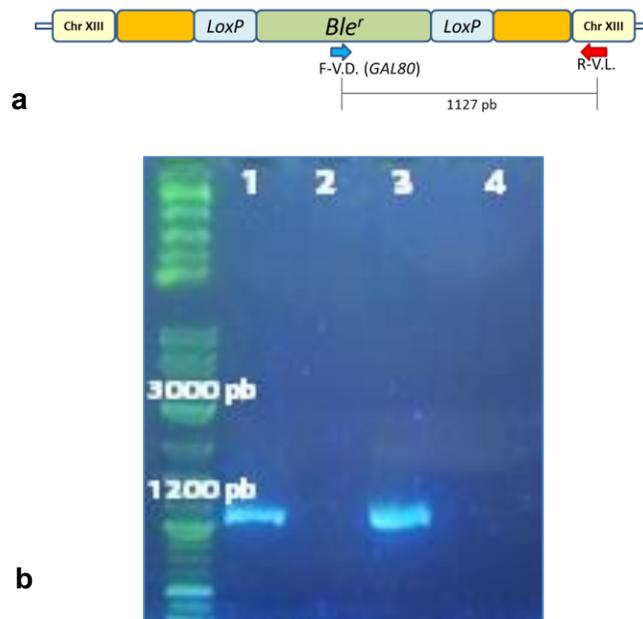


Figura 3-10 – Verificación de recombinantes con el módulo *Ble^r* con iniciadores F-V. D. y R-V. L. a) módulo de silenciamiento, b) electroforesis mostrando los pozos, marcador de peso molecular 1 Kb NEB; Pozo 1: 202-3; Pozo 2: B2G-MAPL; Pozo 3: B8; Pozo 4: control negativo.

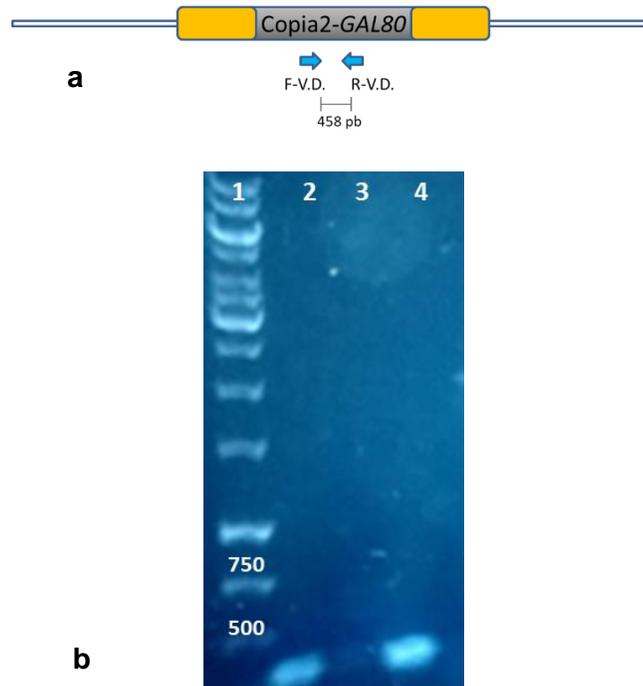


Figura 3-11 – Verificación de silenciamiento completo del gen *GAL80*, a) representación copia 2 gen *GAL80*, b) Electroforesis mostrando los pozos 1: marcador de peso molecular; 2: B8; 3: B2G; 4) 202-3.

En la Tabla 3-7 se encuentra la descripción de la cepa recombinante B2G-MAPL que presenta el silenciamiento completo del gen *GAL80* y la presencia de los módulos de silenciamiento con los marcadores de selección *KanMX* y *Ble^r*.

Tabla 3-7 – Descripción recombinante obtenida con silenciamiento completo del gen *GAL80*.

Cepa	Genotipo o descripción	Fuente o referencia
B2G-MAPL	202-3, <i>gal80Δ::KanMX/gal80Δ::Ble^r</i>	Este trabajo

En la Figura 3-12 se muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido SEM de las recombinantes obtenidas que presentan el gen *GAL80* silenciado parcialmente (R1-MAPL, R2-MAPL) correspondientes a las muestras liofilizadas obtenidas para conservación de estas cepas.

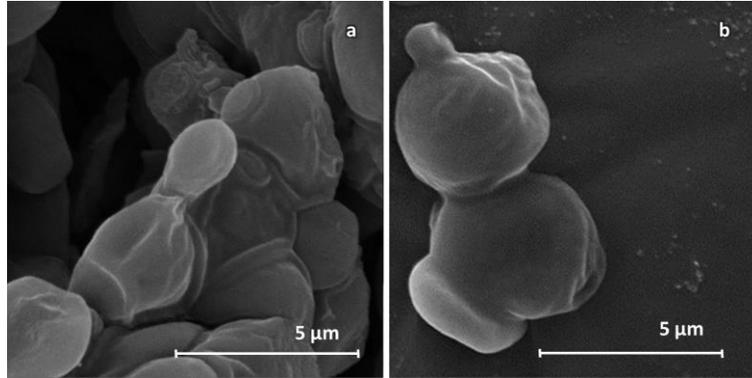


Figura 3-12 – Micrografía SEM de las cepas recombinantes. a) Micrografía de R1-MAPL con una magnificación de 20 000 X y b) R2-MAPL con una magnificación de 20 000 X.

Fue realizada amplificación de la región ITS y de *mating* a las cepas recombinantes obtenidas como se muestra en la Figura 3-13 y en la Figura 3-14. Sus regiones ITS también fueron secuenciadas y analizadas usando la base de datos Blastn del NCBI (Benson et al. 2003) mostrando la similitud esperada para *S. cerevisiae*. Estos análisis fueron realizados para garantizar los resultados obtenidos.

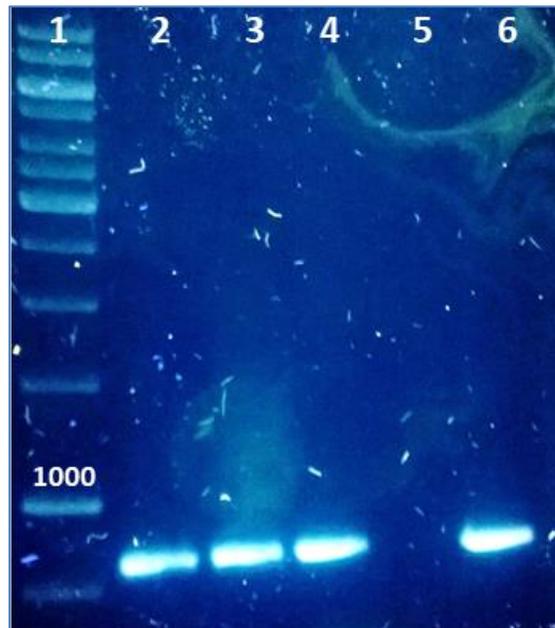


Figura 3-13 – Gel de electroforesis que muestra la amplificación de las regiones ITS en las cepas analizadas, mostrando los pozos 1: Marcador de peso molecular; 2: 202-3; 3: R2-MAPL; 4: B2G-MAPL; 5: Control negativo y 6: CEN.PK2.

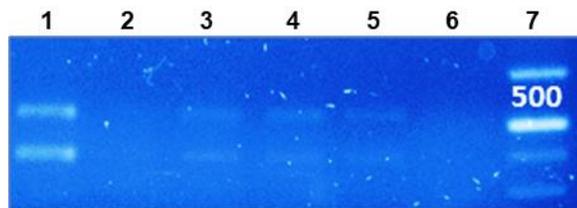


Figura 3-14 – Amplificación *mating* en las cepas mostrando los pozos 1: 202-3; 2: Control negativo; 3: R1-MAPL; 4: R2-MAPL y 5: B2G-MAPL; 6: Control negativo; 7: Marcador de peso molecular.

La asimilación de xilosa fue evaluada en medio YPX con una concentración de xilosa de 20 g/L en la cepa parental 202-3; en las recombinantes R1-MAPL y R2-MAPL (1 copia del gen *GAL80* silenciado); y B2G-MAPL (gen *GAL80* completamente silenciado). Los resultados se grafican en la Figura 3-15.

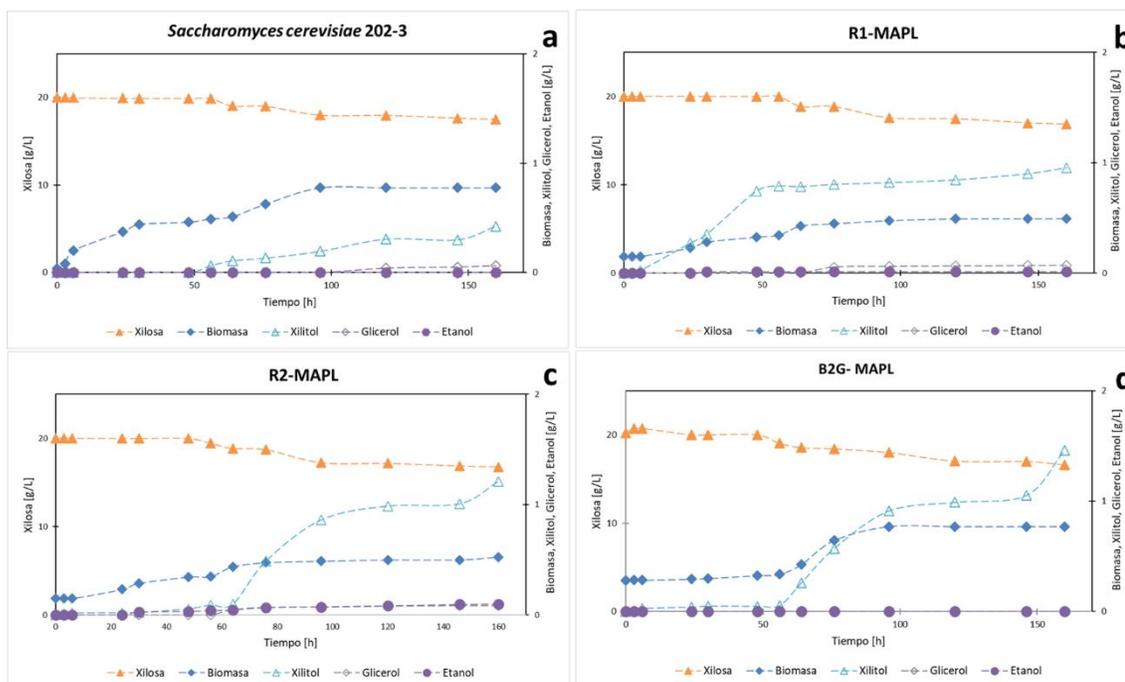


Figura 3-15 – Asimilación de xilosa en la cepa parental y recombinantes en YPX 20 g/L de xilosa. a) 202-3, b) R1-MAPL, c) R2-MAPL y d) B2G-MAPL.

Aunque después de la modificación genética la xilosa no es consumida completamente, sí muestra una mejora en el consumo de esta pentosa en relación con la cepa parental, así como una mayor producción de xilitol. La cepa R1-MAPL consumió la xilosa en un 16 %, la cepa R2-MAPL en un 16 % y la cepa B2G-MAPL en un 18 %. En la producción de xilitol fue alcanzado un rendimiento de 0,302 g/g para la cepa R1-MAPL, 0,374 g/g para la R2-MAPL y 0,407 g/g para la cepa B2G-MAPL. Aunque para la producción de xilitol existen

cepas naturalmente consumidoras de xilosa como por ejemplo *C. tropicalis*, *S. stipitis*, *Debaromyces Hansenii* y *Debaromyces nepalensis*, producir xilitol a partir de una cepa *S. cerevisiae* mejorada es una excelente alternativa a nivel industrial dadas sus características y el conocimiento que se tiene para su manipulación. Además, es considerada un microorganismo GRAS (generalmente reconocido como seguro). Los resultados obtenidos en cuanto al mejoramiento en el consumo de xilosa son similares a los reportados por Cheng y colaboradores (2018), donde el consumo de xilosa fue mejorado en un 13-18% por medio de la sobreexpresión de los genes *CTT1* y *PRX1* en la cepa natural de *S. cerevisiae* YB-2625.

En la Tabla 3-8 se muestran los parámetros cinéticos correspondientes a la asimilación de xilosa por la cepa parental y las recombinantes obtenidas con el silenciamiento del gen *GAL80*. Fueron encontradas diferencias entre las cepas evaluadas, siendo que la cepa que mejor rendimiento presentó fue la B2G-MAPL, seguida de las cepas R2-MAPL y R1-MAPL respectivamente (ver Anexo L).

Tabla 3-8 – Parámetros cinéticos de la asimilación de xilosa por las cepas 202-3, R1-MAPL, R2-MAPL y B2G-MAPL.

Cepas	$Y_{x/s}$	$Y_{xili/s}$	P_x	μ_{max}
202-3	0,300	0,171	0,005	0,009
R1-MAPL	0,108	0,302	0,002	0,010
R2-MAPL	0,116	0,374	0,002	0,010
B2G-MAPL	0,136	0,407	0,003	0,016

Ha sido reportado que las proteínas transportadoras de hexosas codificadas por los genes *HXT1*, *HXT2*, *HXT4*, *HXT5*, *HXT7* y *GAL2* tienen la capacidad de permitir el ingreso de xilosa a la célula (Saloheimo et al. 2007; Bertilsson, Andersson, y Lidén 2008). La producción de xilitol aumentada en las cepas recombinantes sugiere que el silenciamiento del gen *GAL80* podría fomentar la sobreexpresión de los genes *GAL2* y *GCY1*, los cuales son inducidos por el factor de transcripción Gal4. Como se mencionó anteriormente, el gen *GAL2* permite la captación de xilosa en *S. cerevisiae*, lo cual podría estar relacionado con una mayor captación de xilosa por las cepas recombinantes. La posible sobreexpresión del gen *GCY1* que codifica para una enzima xilosa reductasa, podría estar relacionado con la mayor actividad de esta enzima en la cepa y por ende explicaría la mayor producción de xilitol alcanzada en las cepas recombinantes.

3.2.5 Conclusiones

Se realizaron transformaciones genéticas en la cepa 202-3 utilizando la metodología descrita, obteniéndose exitosamente las recombinantes R1-MAPL y R2-MAPL con una copia del gen *GAL80* silenciado, y la recombinante B2G-MAPL con el silenciamiento completo del mismo (2 copias). Las cepas recombinantes obtenidas exhiben un consumo mayor de xilosa y producen al menos 2 veces más xilitol que la cepa parental.

La Tabla 3-9 muestra el resumen de los resultados más relevantes bajo las condiciones analizadas.

Tabla 3-9 – Resumen de resultados para las cepas 202-3, R2-MAPL y B2G-MAPL.

Cepas: parental y recombinantes	Consumo de xilosa 160 h [g/L %]	Producción de xilitol 160 h [g/L]	Rendimiento de xilitol [g/g]
202-3	2,466 12	0,422	0,171
R1-MAPL	3,168 16	0,956	0,302
R2-MAPL	3,227 16	1,202	0,374
B2G-MAPL	3,590 18	1,462	0,407

4. Ingeniería evolutiva en la cepa 202-3 y recombinantes

La ingeniería evolutiva ha sido aplicada en cepas de *S. cerevisiae* y ha permitido la obtención de cepas con características mejoradas (Sonderegger y Sauer, 2003; Tamari *et al.*, 2016; Patiño, 2015; Zeng *et al.*, 2017; Kuyper *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2012; Scalcinati *et al.*, 2012). Es una estrategia atractiva porque permite la obtención de un fenotipo deseado al promover la inducción de mutaciones en las cepas por presión selectiva. Mutaciones espontáneas o inducidas han sido reportadas en algunos trabajos realizados que muestran consumo de xilosa en cepas recombinantes de *S. cerevisiae* (Ni, Laplaza, y Jeffries, 2007).

En este capítulo se describen las metodologías utilizadas, los resultados obtenidos y su discusión, considerando la literatura científica disponible, con el fin de dar cumplimiento al objetivo específico de la investigación respecto a realizar ingeniería evolutiva en la cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae* 202-3 y recombinantes usando xilosa como fuente de carbono.

4.1 Materiales y métodos

4.1.1 Experimento de ingeniería evolutiva

Para el experimento de ingeniería evolutiva fueron seleccionadas las recombinantes R2-MAPL y B2G-MAPL considerando que ésta última, con el silenciamiento completo del gen *GAL80*, surgió a partir de la recombinante R2-MAPL. De esta manera se podía comparar los resultados del proceso de evolución en la cepa parental y en las recombinantes, teniendo en cuenta que la parental 202-3 dio origen por ingeniería genética a la recombinante R2-MAPL.

La cepa 202-3, la recombinante R2-MAPL y la recombinante B2G-MAPL fueron crecidas por separado en medio líquido YPX con una concentración de xilosa de 20 g/L durante 144

horas. Transcurrido ese tiempo fueron tomadas células de levadura de cada uno de los pre-inóculos para realizar el inóculo inicial con una absorbancia a 600 nm de aproximadamente 0,5. De cada una de las cepas, fueron realizados cultivos en triplicado. Se realizaron medidas de crecimiento de biomasa en los tiempos 0, 96 y 144 horas. Se tomaron alícuotas que fueron analizadas para determinar la obtención de productos por HPLC. A las 144 horas se realizó un nuevo inóculo con la muestra del triplicado que presentó mayor crecimiento, seleccionada por la que midió una mayor absorbancia. Este proceso se realizó sucesivamente hasta el inóculo 8, completando en total 54 días. En la Figura 4-1 se representa esquemáticamente el proceso de ingeniería evolutiva adaptativa.

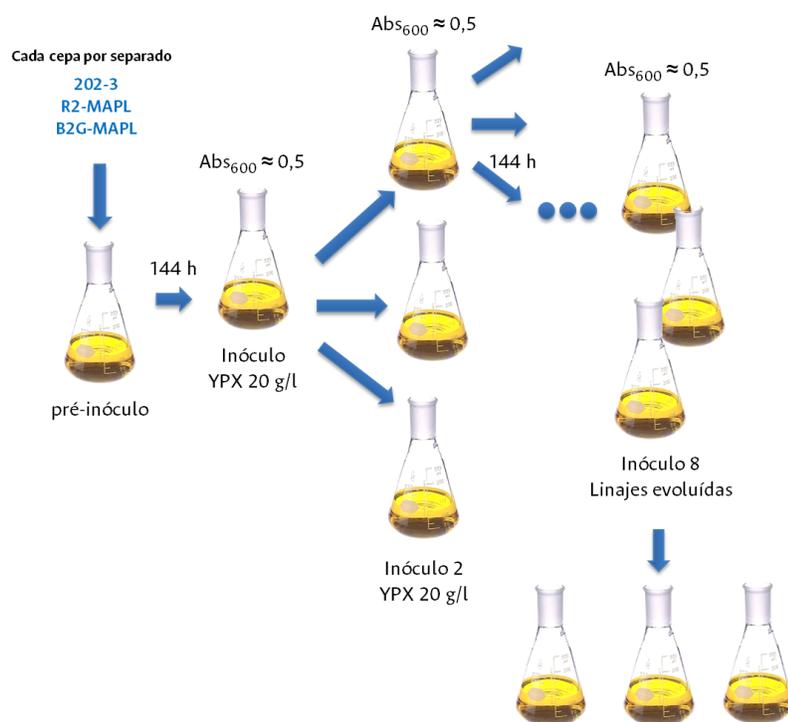


Figura 4-1 – Diagrama experimento ingeniería evolutiva.

4.2 Resultados y discusión

4.2.1 Ingeniería evolutiva

La ingeniería evolutiva es una estrategia basada en el principio de selección y mutación natural para el mejoramiento de linajes permitiendo obtener cepas con características diferenciadas. El pre-inóculo fue realizado en medio rico usando únicamente la xilosa como fuente de carbono, a pesar de que desde experimentos preliminares fue observado que la cepa 202-3 mejora el consumo de esa pentosa cuando su pre-inóculo es realizado en

glucosa. Como en este experimento se buscaba realizar una presión selectiva a la cepa para mejorar su fenotipo positivo en relación con la xilosa, se creció la cepa en ese azúcar para iniciar el proceso de ingeniería evolutiva. El consumo inicial de xilosa por la cepa 202-3 fue del 7 % (inóculo 1) y al finalizar el inóculo 8 fue del 14%, mejorando en un 7% esa habilidad de consumir la pentosa respecto al sustrato inicial de 20 g/L. En relación con el xilitol, la producción aumentó al finalizar el proceso en 345%, es decir, 0,236 g/g en el inóculo 1 a 1,050 g/g en el inóculo 8.

Las cepas obtenidas en esta investigación por ingeniería evolutiva adaptativa se describen en la Tabla 4-1 con la nomenclatura utilizada para identificar las cepas de origen 202-3 y recombinantes con la evolución respectiva. Estas cepas aumentaron su capacidad de consumo de xilosa como se muestra más adelante en los gráficos de crecimiento.

Tabla 4-1 – Descripción cepas obtenidas por evolución adaptativa.

Cepa	Genotipo o descripción	Referencia
202-3-MA8	<i>S. cerevisiae</i> 202-3&ea ^a	Este trabajo
R2-MAPL8	202-3, <i>GAL80/gal80Δ::KanMX</i> &ea ^a	Este trabajo
B2G-MAPL8	202-3, <i>gal80Δ::KanMX/gal80Δ::Ble^r</i> &ea ^a	Este trabajo
Nota: (a) evolución adaptativa		

En la Figura 4-2 (a) se muestran gráficamente los resultados de la ingeniería evolutiva en la cepa parental 202-3 desde el inóculo 1 al 8, respecto a la producción de biomasa, consumo de xilosa y producción de xilitol. En la Figura 4-2 (b) se representan los resultados de la ingeniería evolutiva en la cepa recombinante R2-MAPL desde el inóculo 1 al 8. El consumo inicial de xilosa por la cepa R2-MAPL en este ensayo fue del 13% (inóculo 1) y al finalizar, en el inóculo 8, fue del 20% mejorando el consumo en un 7% respecto a la concentración del sustrato inicial. En relación con el xilitol, la producción en el inóculo 8 aumentó en 196%, es decir, de 0,996 g/g en el inóculo 1 a 2,951 g/g en el último. En la Figura 4-2 (c) se grafican los resultados de la ingeniería evolutiva en la cepa recombinante B2G-MAPL desde el inóculo 1 hasta el inóculo 8. El consumo inicial de xilosa por la cepa B2G-MAPL fue del 14% (inóculo 1) y en el inóculo 8 fue del 28%, mejorando en un 14% respecto al sustrato inicial de 20 g/L de xilosa. En relación con el xilitol, la producción aumentó en 337%, de 1,115 g/g en el inóculo 1 a 4,876 g/g en el inóculo 8. La cepa B2G-MAPL es la que presentó las mejores condiciones de consumo del azúcar, producción y rendimiento de xilitol (ver Anexo M).

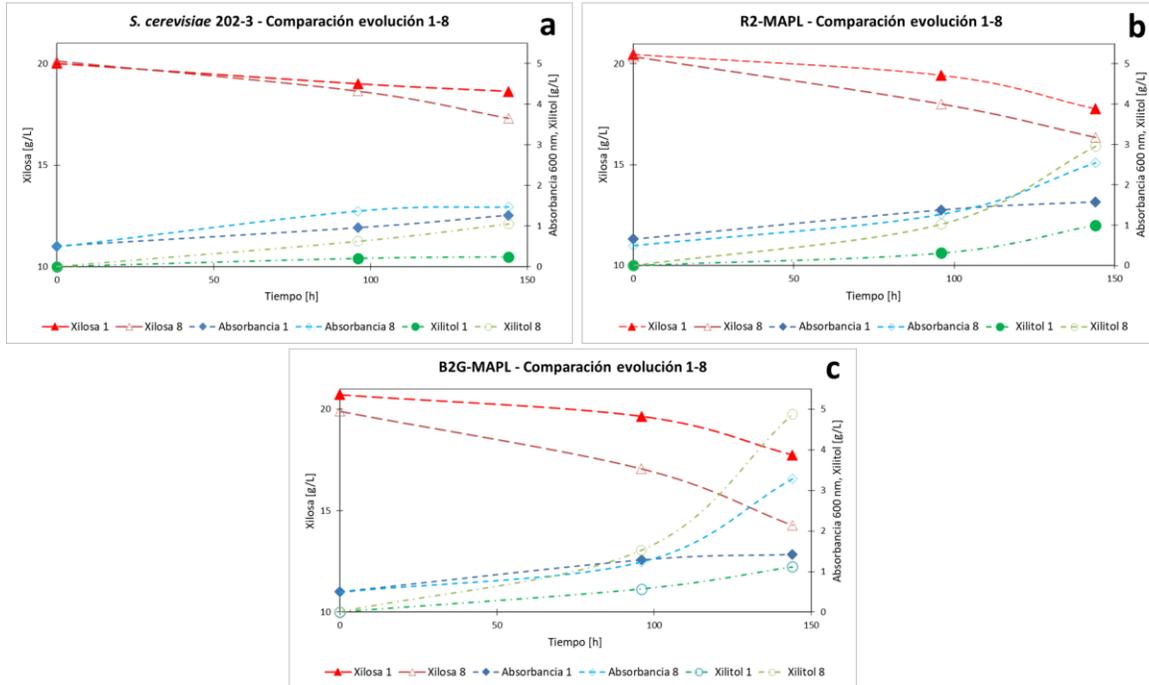


Figura 4-2 – Ingeniería evolutiva en la cepa parental y en las cepas recombinantes. a) cepa 202-3 inóculo 1, cepa 202-3 inóculo 8 denominada 202-3-MA8, b) cepa R2-MAPL inóculo 1, cepa R2-MAPL inóculo 8 denominada R2-MAPL8, b) cepa B2G-MAPL inóculo 1, cepa B2G-MAPL inóculo 8 denominada B2G-MAPL8.

En la Figura 4-3 se compara con el diagrama de Pareto, los cambios ocurridos en la biomasa, consumo de xilosa y rendimiento de xilitol para las cepas 202-3, R2-MAPL y B2G-MAPL parentales (para el inicio de la ingeniería evolutiva) con las cepas obtenidas al finalizar la evolución (inóculo 8). Se observan las diferencias significativas en el rendimiento final de xilitol obtenido por las cepas modificadas por evolución, como también el incremento notable en el consumo de xilosa. El aumento en la biomasa también se observa para las 3 cepas analizadas. Las barras de error representan la desviación estándar de los 3 ensayos repetidos.

La Figura 4-4 muestra una comparación de la cepa parental 202-3 con la cepa recombinante evolucionada B2G-MAPL8 en producción de biomasa [g/L], consumo de xilosa [g/L] y rendimiento de xilitol [g/g]. Esa representación resume la mejora del fenotipo alcanzado por la cepa parental 202-3 evolucionada a la cepa B2G-MAPL. La Figura 4-4 deja en clara evidencia que el abordaje utilizado permitió finalmente una mejora bastante considerable en relación con el consumo de xilosa de la cepa nativa 202-3, superior al 400 %. Por otra parte, se muestra que el rendimiento xilitol pasó de 0,170 g/g en la cepa parental 202-3 a 0,869 g/g en la cepa evolucionada obtenida B2G-MAPL, lo que representa

un incremento de más del 500%. Por tanto, la cepa obtenida B2G-MAPL muestra un potencial evidente para la obtención industrial de xilitol implementando un proceso biotecnológico adecuado. A pesar de que comercialmente el xilitol tiene un alto valor agregado (del orden de USD\$5 por kilogramo), si se quisiera convertir este producto químico en otro compuesto como el etanol, podría seguirse un abordaje en el que se permitiera la sobreexpresión de una enzima xilosa deshidrogenasa y conducir ese flujo de carbono hacia el etanol.

El trabajo con cepas nativas es bastante prometedor, así como el abordaje seguido en este proyecto de investigación, pudiendo ser aplicado para la obtención de otros productos químicos de muy alto valor agregado.

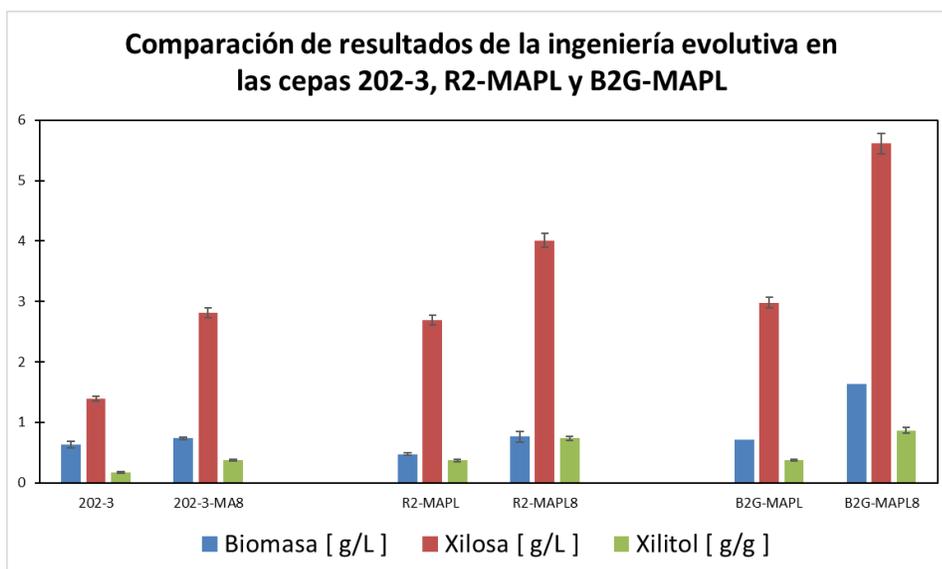


Figura 4-3 – Comparación de resultados de ingeniería evolutiva sobre la cepa parental 202-3, recombinante R2-MAPL y recombinante B2G-MAPL con relación a producción de biomasa [g/L], consumo de xilosa [g/L] y rendimiento de xilitol [g/g].

Aunque la evidencia muestra que la xilosa puede inducir las actividades *XR* y *XDH*, o de algunos de los genes implicados en el metabolismo de la xilosa, las actividades específicas de estas enzimas son bajas en *S. cerevisiae* comparadas con otras levaduras como se describe en el capítulo 1. En cambio, el silenciamiento del gen *GAL80* sí podría estar habilitando la sobreexpresión del gen *GCY1* que tiene una actividad xilosa reductasa aumentando la producción de xilitol como se muestra en la representación de la ruta de utilización de xilosa mostrada en la Figura 1-2.

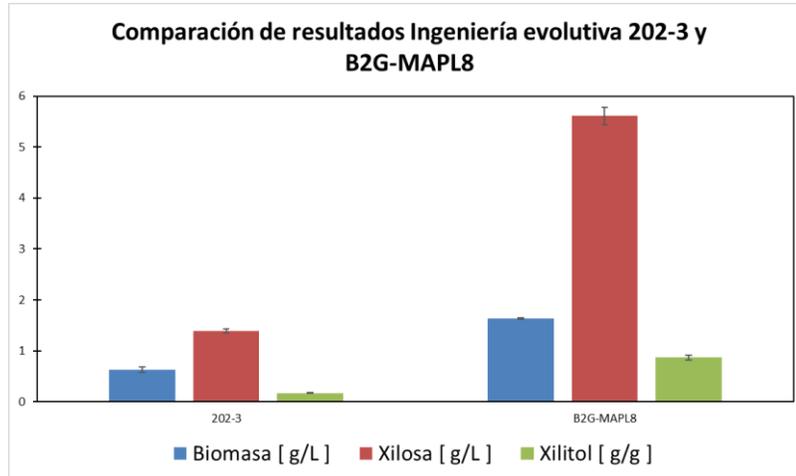


Figura 4-4 – Comparación de resultados de ingeniería evolutiva de la cepa parental 202-3 (inicial) y cepa recombinante evolucionada B2G-MAPL (final) con relación a producción de biomasa, consumo de xilosa y rendimiento de xilitol [g/g].

La acumulación de xilitol en las cepas recombinantes de *S. cerevisiae* es una dificultad para el aprovechamiento de xilosa para la producción de etanol, asociado principalmente por el desequilibrio redox entre la *XR* y enzimas *XDH* con diferente especificidad por las coenzimas NADPH y NADH (Bruinenberg *et al.*, 1984; Cadete *et al.*, 2016; Hou, 2012). Una propuesta preliminar de esta investigación era obtener etanol a partir de xilosa, pero el abordaje utilizado permitió conseguir el notable mejoramiento en el consumo de xilosa y la producción de xilitol. La producción de xilitol de esta forma es muy atractiva porque permitiría la utilización de la xilosa presente en los abundantes desechos agrícolas, agroforestales y otros recursos naturales renovables, abriendo una nueva perspectiva a la producción industrial de xilitol, la cual es costosa, de bajo rendimiento y difícil de obtener.

Este resultado de abundante producción de xilitol tanto en la cepa parental y mayor aún en las recombinantes podría estar relacionado a que la actividad xilosa reductasa se favorece a lo largo del experimento de evolución permitiendo una mayor producción de xilitol. En otras investigaciones que buscan el mejoramiento de la producción de etanol por cepas *S. cerevisiae*, se sugiere que el desbalance de los cofactores NADPH y NAD⁺ es un problema que favorece que el xilitol sea un producto abundante que no permite la producción de etanol (Kötter y Ciriacy, 1993). Sin embargo, para esta investigación sí fue muy interesante alcanzar una elevada producción de xilitol teniendo en cuenta que este es un producto con un alto valor agregado a nivel comercial. El xilitol es un compuesto ampliamente usado en las industrias alimenticia y médica, usado como un azúcar sustituto para pacientes diabéticos (Zha *et al.*, 2013). Su importante demanda se atribuye a su bajo

contenido calórico, bajo índice glicémico y al hecho de no afectar el valor nutricional de los alimentos (Espinoza-Acosta, 2020). Aunque existen microorganismos capaces de convertir xilosa a xilitol, el rendimiento alcanzado por las cepas evolucionadas de *S. cerevisiae* muestran su gran potencial de uso en la industria química con las ventajas que su uso representa frente a otros procesos.

La cepa B2G-MAPL8 fue obtenida a partir de diferentes procesos de mejoramiento de la cepa parental 202-3 que incluyeron el silenciamiento completo del gen *GAL80* y el proceso de ingeniería evolutiva, que dio como resultado consumo mejorado de xilosa en más del 400 %, rendimiento mejorado de xilitol en más de 500 % y producción mejorada de xilitol a las 144 h en poco menos del 2000 % respecto a la cepa parental 202-3, que de por sí ya presenta valores superiores a lo previamente reportado en la literatura científica. Para llegar a este resultado se realizó la verificación y confirmación de la especie y de su fenotipo positivo para xilosa, el silenciamiento completo del gen *GAL80* que involucró diferentes procesos de recombinación y verificación, y finalmente ingeniería evolutiva.

4.3 Conclusiones

La cepa parental 202-3 y las cepas recombinantes mejoraron su fenotipo en xilosa con la utilización de la ingeniería evolutiva. Las cepas obtenidas del proceso de evolución presentaron una producción de xilitol mayor que la cepa parental 0,373 g/g (202-3) con valores de rendimientos de 0,736 g/g (R2-MAPL) y 0,869 g/g de xilosa (B2G-MAPL). La cepa B2G-MAPL con el silenciamiento completo del gen *GAL80* presentó el mejor perfil de asimilación en xilosa. En la Tabla 4-2 se presenta el resumen de resultados para las cepas evolucionadas obtenidas después de 8 inóculos de 144 h cada uno, es decir, 54 días incluido los pre-inóculos.

Tabla 4-2 – Resumen de resultados más significativos de las cepas obtenidas por evolución adaptativa.

Cepas: parental y evolucionadas	Consumo de xilosa 144 h [g/L %]	Producción de xilitol 144 h [g/L]	Rendimiento de xilitol [g/g]
202-3	1,389 7	0,236	0,170
202-3-MA8	2,812 14	1,050	0,373
R2-MAPL	2,694 13	0,996	0,370
R2-MAPL8	4,012 20	2,951	0,736
B2G-MAPL	2,981 14	1,115	0,374
B2G-MAPL8	5,613 28	4,876	0,869
B2G-MAPL8 vs 202-3	404,2 %	1982,1 %	511,2 %

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

La cepa de levadura 202-3 aislada en territorio colombiano fue confirmada como perteneciente a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Esta confirmación se realizó empleando iniciadores específicos para la identificación de la especie y por la secuenciación de su región ITS, que por medio de un análisis de la secuencia consenso mostró más del 95% de similitud de esta región respecto a otras *S. cerevisiae* reportadas en la base de datos Blastn de NCBI.

Por medio de diferentes ensayos en los cuales la única fuente de carbono fue la xilosa, el aislado natural de *Saccharomyces cerevisiae* 202-3 evidenció una capacidad innata de metabolizar el azúcar xilosa con una producción modesta del alcohol xilitol. En dicha cepa se verificó la presencia de los genes putativos involucrados en la metabolización de la xilosa en *S. cerevisiae*.

Mediante ingeniería genética se obtuvo exitosamente dos recombinantes de la cepa 202-3 con una copia del gen *GAL80* silenciado (R1-MAPL y R2-MAPL) y otra recombinante con el silenciamiento completo del mismo (B2G-MAPL). Estas cepas recombinantes muestran un consumo mayor de xilosa, produciendo al mismo tiempo al menos 2 veces más xilitol que la cepa parental salvaje.

Mediante ingeniería evolutiva, la cepa parental 202-3 y las cepas recombinantes previamente obtenidas mejoraron su fenotipo en xilosa. Las cepas evolucionadas obtenidas mostraron una producción de xilitol mayor que las cepas parentales usadas como inóculo inicial así: para la cepa 202-3-MA8 el rendimiento de xilitol fue de 0,373 g/g, mejor en 345%; para la cepa R2-MAPL8 el rendimiento obtenido fue de 0,736 g/g, mejor en 196%; y para la cepa B2G-MAPL8 el rendimiento de xilitol fue de 0,869 g/g, mejor en 337% que la parental. La cepa B2G-MAPL con el silenciamiento completo del gen *GAL80*

fue la que presentó el mejor perfil de asimilación en xilosa y producción de xilitol, mejorando en 404,2 % el consumo de xilosa respecto a la cepa parental, en 511.2 % el rendimiento de xilitol y en 1982,1 % la producción de ese polialcohol a las 144 horas.

De los resultados obtenidos se concluye finalmente que la combinación de ingeniería genética y evolutiva con el abordaje utilizado en esta investigación para la levadura salvaje 202-3 mejoró considerablemente su fenotipo en la utilización de xilosa.

5.2 Recomendaciones y perspectivas

Se recomienda realizar una caracterización de la actividad enzimática de las enzimas endógenas XR y XDH de la cepa 202-3. Esto permitirá conocer la actividad de estas enzimas involucradas en la metabolización de la xilosa y planear estrategias de mejoramiento de esas actividades enzimáticas.

Dadas las características de la cepa 202-3, se recomienda continuar con estrategias de ingeniería genética y metabólica de levaduras. El silenciamiento y sobreexpresión génica en otros genes de interés permitiría no sólo mejorar el consumo de xilosa y producción de xilitol, sino también poder usar el microorganismo como plataforma en la obtención de otros productos de interés comercial, dado el conocimiento adquirido en la manipulación de esta levadura.

Dado que la cepa 202-3 es diploide se podría silenciar el gen de *mating HO* con el fin de obtener células haploides que harían más sencilla su manipulación en cuanto a silenciamiento génico por la metodología utilizada.

Considerando que la cepa 202-3 presenta rendimientos y productividades de etanol muy altos en la presencia de glucosa, esta cepa nativa podría ser utilizada en la producción industrial de etanol de primera generación.

Se recomienda realizar el silenciamiento del gen *GAL80* en la cepa evolucionada 202-3MA8 para analizar un posible mejoramiento adicional en el consumo de xilosa y la producción de xilitol.

Se recomienda continuar con los trabajos de sobreexpresión adelantados en los transportadores involucrados en la captación de xilosa en *S. cerevisiae* y de genes heterólogos que codifican para las enzimas con actividad xilitol deshidrogenasa y xilulosa

quinasa. Estos trabajos fueron realizados en esta investigación, pero no han sido finalizados pues faltan procesos de verificación que incluyen la sobreexpresión de los genes transportadores *HXT2*, *HXT7*; el gen *GCY1* que codifica para un glicerol deshidrogenasa con actividad xilosa reductasa y el gen *XYL2* que codifica para un xilitol deshidrogenasa usando los propios genes de la cepa 202-3 y también de la cepa CEN.PK2.

Se recomienda adelantar el abordaje de este trabajo realizando crecimientos en biorreactores con condiciones controladas de oxígeno con el fin de analizar su relación con el consumo de xilosa u otras fuentes de carbono para la obtención de productos de interés de alto valor agregado.

Teniendo en cuenta los resultados fenotípicos de esta cepa, se podría estudiar la aplicación potencial del abordaje de este trabajo para el desarrollo y la obtención de otros productos de interés comercial como por ejemplo medicamentos, probióticos (analizando propiedades antifúngicas, antibacteriales, actividad antagonista contra patógenos humanos, entre otros) y obtención de enzimas entre otros.

A. Anexo: Certificado depósito de cepas en el BANCO DE CEPAS Y GENES DEL IBUN

Instituto de Biotecnología (IBUN)
Sede Bogotá



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Bogotá, D. C.

[IB - 159 - 17]

CERTIFICACIÓN

El Instituto de Biotecnología, certifica que el profesor **MARIO ENRIQUE VELÁSQUEZ LOZANO** de la Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia, depositó las cepas relacionadas en la tabla adjunta en la Colección Biológica **BANCO DE CEPAS Y GENES DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**, los códigos de identificación van del IBUN-090-03499 a la IBUN-0-03683, es de anotar que estas cepas se encuentran disponibles para ser usadas en los proyectos cuando se requiera por parte del profesor.

Se expide la presente a solicitud del interesado el día 11 de agosto de 2017

CARLOS ARTURO MARTÍNEZ RIASCOS
Director

B. Anexo: Permiso para exportación



ANLA
AUTORIDAD NACIONAL
DE LICENCIAS AMBIENTALES

**PERMISO PARA EXPORTACIÓN
Y/O IMPORTACIÓN DE ESPECÍMENES DE LA
DIVERSIDAD BIOLÓGICA NO LISTADOS EN LOS
APÉNDICES DE LA CONVENCIÓN CITES.**



Libertad y Orden
República de Colombia

Importación

Exportación

No. **01178**

FINALIDAD: COMERCIAL

INVESTIGACIÓN

OTRO

ACOGE EL CONCEPTO TÉCNICO N°187 del 29/01/18
(NCT0019-00-2018)

VÁLIDO HASTA: Abril 28 de 2018

DESTINATARIO UNIVERSIDAD DE SÃO PAULO. Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 20 Cidade Universitária TELÉFONO N°:(+11) 30912260 SÃO PAULO – BRASIL.	EXPORTADOR UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA Carrera 45 # 26-85. TELÉFONO N°+57 1 3165000 ext 20018 BOGOTA- COLOMBIA
PAIS DESTINO Y PUERTO DE ENTRADA SÃO PAULO – BRASIL.	PAIS- PUERTO DE SALIDA BOGOTA- COLOMBIA

DESCRIPCION DEL TIPO DE PRODUCTO O ESPECIMEN	CLASE	ORDEN	ESPECIE	NOMBRE COMUN	DESCRIPCION	NÚMERO DE MUESTRAS
Exportación de especies no listadas en la Convención CITES con fines de investigación. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, deberá solicitar la respectiva verificación ante la autoridad ambiental competente en puerto. *Este permiso no ampara el acceso a recursos genéticos.	Saccharomycetes	Saccharomycetales	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levaduras	10 muestras en tubos de 1,5ml	10
TOTAL						10

Autorización de embarque No.
 Este Permiso es otorgado por:

MARGIT IVETTE SOLARTE LIEVANO
 Subdirectora de Instrumentos Permisos y Trámites Ambientales
 Autoridad Nacional de Licencias Ambientales - ANLA

Bogotá D.C
LUGAR

Enero 29 de 2018
FECHA


 FIRMA

Elaboró: Jennifer Ardiila Ayala

Pág 1-1

RENTAS AMBIENTALES S.A. CUC 88332114 1 020 983322

C. Anexo: Respuesta INVIMA a derecho de petición



La salud
es de todos

Minsalud

CORRESPONDENCIA SALIENTE
Para Rad: 20202017171 Radicado 20202017171
Folios: 1 Clave: 534041
De: GRUPO DEL SISTEMA DE ANÁLISIS DE
RIESGOS QUÍMICOS EN ALIMENTOS Y
BEBIDAS.
Para: UNIVERSIDAD NACIONAL DE
COLOMBIA
Fecha: 27/04/2020 Usuario: cdelahoze

Bogotá, D.C, abril 24 de 2019
4100- 2833-19

Señor
Juan Pablo Rosas
Carrera 45 # 26-65,
Vicerrectoría de investigación
Bogotá, Colombia
E-mail: perminambiente@unal.edu.co

REFERENCIA: Respuesta derecho de petición 20201055803

En atención a su comunicación radicada en la entidad bajo el número de la referencia, nos permitimos dar respuesta a su inquietud de la siguiente manera:

Con relación al estado de su solicitud, le informamos que esta fue discutida y analizada el 24 de abril de 2020 en el Comité Técnico Nacional de Bioseguridad OVM con uso en salud y alimentación humana exclusivamente (CTNSalud).

En dicho comité quedo suscrito en el acta 1/2020, que dada la información presentada, no se requiere expedir una autorización por parte del CTNSalud para el acceso a recursos genéticos o desempeñar las actividades en medio confinado para "*Caracterizar y mejorar cepas de levaduras nativas para la producción de alcoholes y demás metabolitos secundarios de fermentación.* Por lo anterior, pueden continuar con su proyecto, siempre y cuando el producto final de dicha investigación no sea utilizado o comercializado en el ámbito de salud o alimentación humana, para lo cual requerirían elevar una consulta al CTNSalud para ser analizada.

Cordialmente,


CARLOS ALBERTO ROBLES COCUYAME
Director de Alimentos y Bebidas.

Proyectó: Gabriel Mutis Namur

27/04/2020

X

Aprobó
Coordinador GSAROAB
Firmado por: Cristian Moises De la Hoz Escorda

Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos - Invima
Oficina Principal: Cra 10 N° 64 - 28 - Bogotá
Administrativo: Cra 10 N° 64 - 60
(1) 2948700
www.invima.gov.co


Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos

D. Anexo: Aval de ética Facultad de Ciencias



COMITÉ DE ÉTICA FACULTAD DE CIENCIAS

Bogotá, 21 de agosto de 2020

Profesor
Mario Enrique Velásquez Lozano
Facultad de Ingeniería

Respetado Profesor:

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 20 de agosto de 2020 (Acta 09-2020), evaluó aspectos éticos del proyecto presentado por usted. Como resultado de esta revisión, el Comité considera que el proyecto **cumple** con los aspectos éticos básicos. Para los fines pertinentes, se transcriben las observaciones y el concepto final.

Proyecto / Investigadores – Grupos – Dependencias / Observaciones.

Proyecto P36. Mejoramiento genético de una levadura *Saccharomyces cerevisiae* aislada en territorio colombiano para la fermentación de xilosa.

Responsables. Mario Enrique Velásquez Lozano (Investigador Principal, Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos), Margareth Andrea Patiño Lagos (Tesis de Doctorado en Biotecnología) y Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk (CoDirector de Tesis, Grupo de Investigación en Biología Molecular y Biotecnología de Levaduras, UFSC, Brasil).

Tipo de estudio. Intervención biotecnológica sobre organismos nativos.

Los principales aspectos éticos, legales y ambientales a tener en cuenta por los investigadores están relacionados con:

1. **Protocolos de bioseguridad.** BPL y sistema institucional de gestión ambiental (disposición de residuos químicos y biológicos).
2. **Guías y pautas normativas.** Resolución 008430 de 1993 (MinSalud). El organismo *S. cerevisiae* se clasifica en Grupo de Riesgo I (microorganismos que representan escaso riesgo para el individuo y la comunidad). La levadura utilizada pertenece al Banco de Cepas y Genes del IBUN. Contrato de Acceso a recursos Genéticos y Productos Derivados No. 121 de 2016, y Otrosí No 8 para el proyecto "Producción de alcoholes utilizando cepas nativas de levaduras colombianas". Pronunciamiento del INVIMA en el sentido de que "el producto final de esta investigación no sea utilizado o comercializado en el ámbito de salud o alimentación humana".
3. **Propiedad intelectual** (protección de los desarrollos y cumplimiento de normativas). Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional de Colombia.

Concepto: Proyecto Avalado.

Luis Fernando Ospina Giraldo
Coordinador Comité de Ética

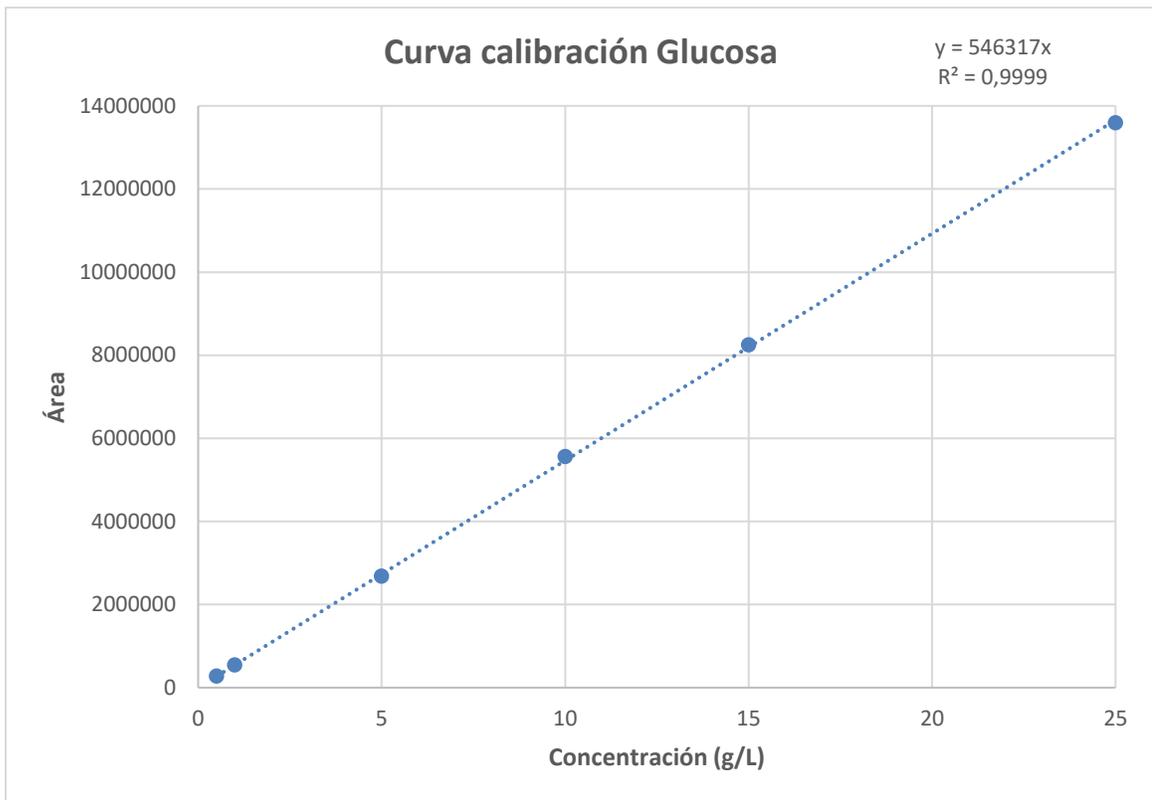
E. Anexo: Protocolo extracción de ADN genómico de levaduras

A continuación, se describe un protocolo usado en la extracción de ADN genómico de levaduras.

1. Las levaduras son inoculadas en 5 mL de medio líquido (YPD) e incubadas toda la noche a 28-30 °C sobre agitación orbital a 160 rpm.
2. Centrifugar el cultivo a 8500 rpm por 5 min.
3. Descartar sobrenadante y lavar el precipitado con 1 mL de Solución 1 [50 mM Na₂EDTA (pH 7,5)], aplicar agitación con vórtex y transferir a tubos de 2 mL.
4. Centrifugar a 10000 rpm por 5 min.
5. Retirar sobrenadante todo con pipeta y resuspender en 1 mL de Solución 2 [50 mM de Tris-H₂SO₄/1% 2 mercaptoetanol] por 15 min a temperatura ambiente.
6. Centrifugar a 5000 rpm por 10 min.
7. Descartar sobrenadante y resuspender en Solución 3 [1 mL de 0,1 M NaCl/10mM Tris HCl (pH 7,5) /10 mM Na₂EDTA/0,2 % SDS], agregar 0,7 mL (700 µl) de fenol (phenol equilibrated stabilized: Chloroform: Isoamyl Alcohol 25:24:1 pH 8,0) e incubar la muestra a temperatura ambiente 30 min con agitación.
8. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min, se toma la fase acuosa.
9. La fase acuosa contiene los ácidos nucleicos (p, e,: 700 µl), Se adiciona 1/10 del volumen (p, e,: 70 µl) de Acetato de Potasio 3 M pH 5,5 frío (10 min).
10. Se precipitan los ácidos nucleicos con 1 mL de isopropanol frío.
11. Incubar a temperatura ambiente por 5 min y centrifugar a 13000 rpm durante 10 min.
12. El precipitado se lava con 1 mL de etanol al 70 %, centrifugar a 13000 rpm 10 min.
13. Eliminar el etanol y resuspender en 50 µl de TE pH 8,0 o agua ultrapura.

F. Anexo: Modelo de curvas de calibración patrones para la cuantificación por HPLC

A continuación, se encuentra un ejemplo de modelo de curva de calibración para los patrones utilizados en las corridas de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia,

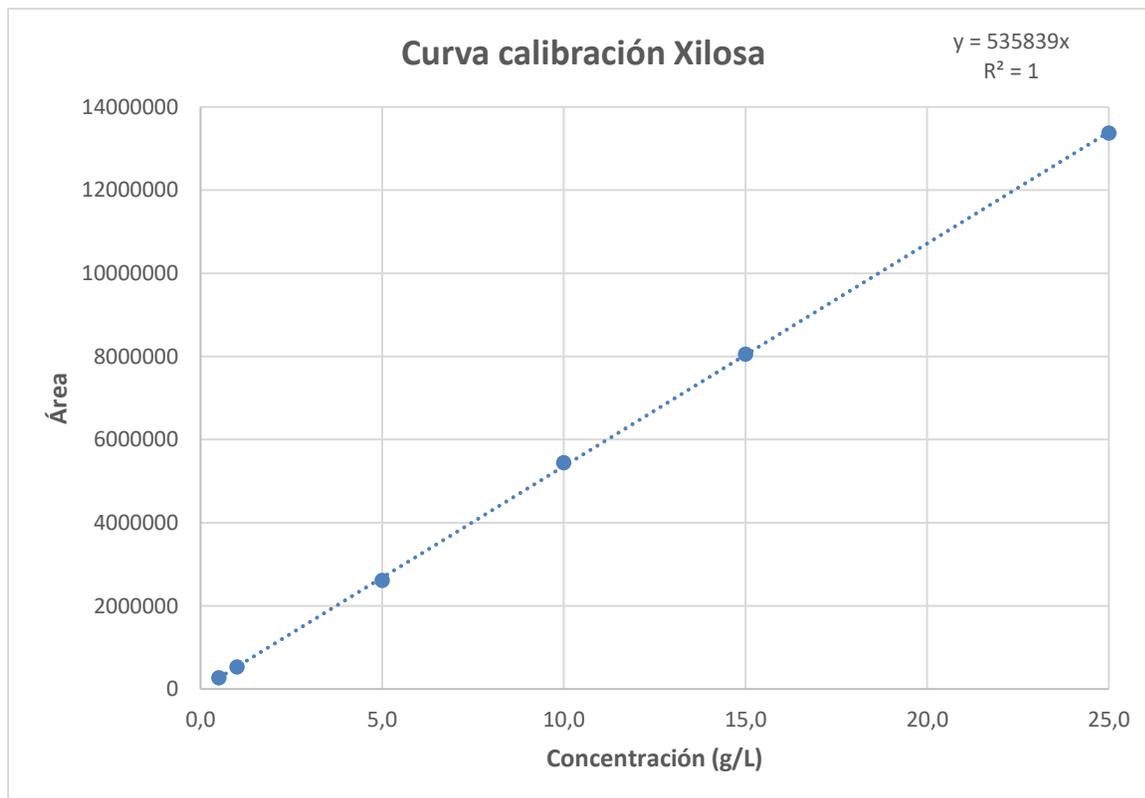


Modelo de ecuación para la determinación de glucosa:

$$glucosa \text{ en } \frac{g}{L} = \frac{\text{área}}{546317}$$

Glucosa					
Concentración	Tiempo Retención	Área	Promedio []	Promedio Área	Desviación estándar
0,5	9,081	277414	0,5	276889	910,8
0,5	9,082	275837			

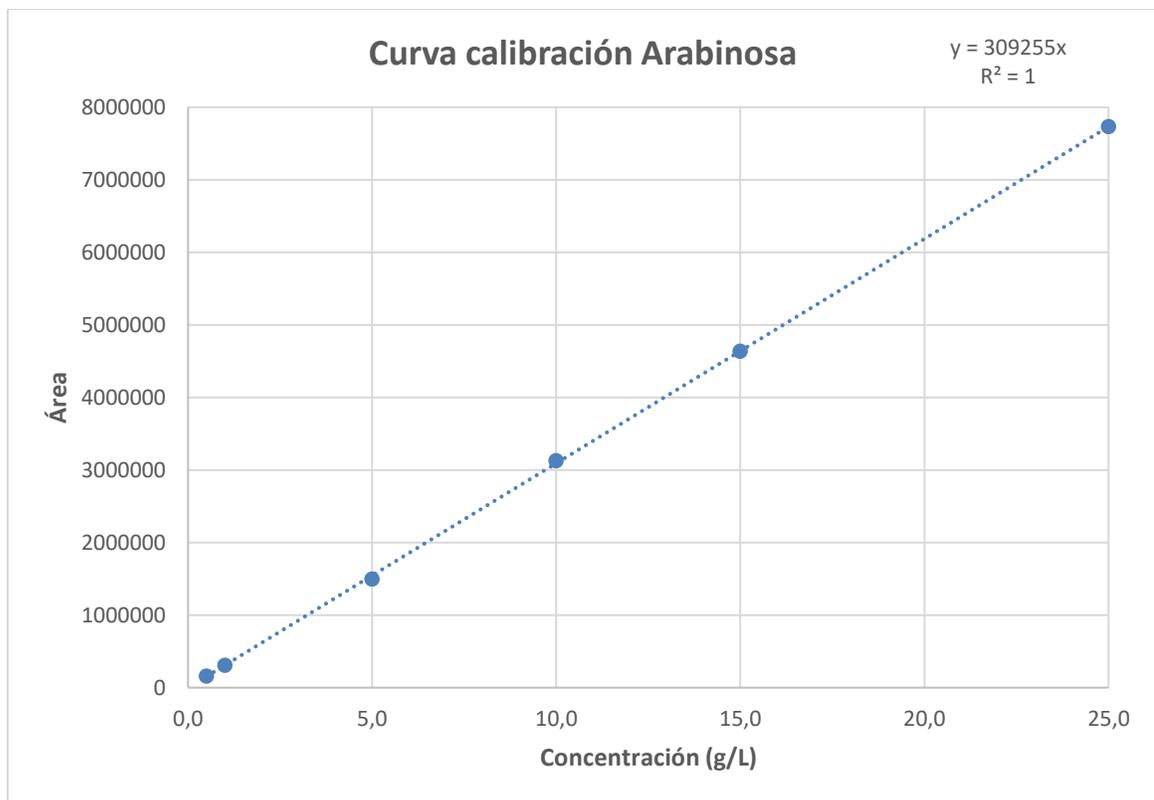
0,5	9,081	277415			
1,0	9,083	531181			
1,0	9,081	563251	1	546880	16045,6
1,0	9,082	546208			
5,0	9,079	2648461			
5,0	9,081	2699620	5	2682357	29356,5
5,0	9,081	2698990			
10,0	9,082	5521271			
10,0	9,081	5562841	10	5562532	41106,9
10,0	9,079	5603483			
15,0	9,082	8274012			
15,0	9,081	8262861	15	8251215	30345,7
15,0	9,079	8216771			
25,0	9,091	13595827			
25,0	9,094	13599261	25	13594070	6257,3
25,0	9,095	13587122			



Modelo de ecuación para la determinación de xilosa:

$$xilosa \text{ en } \frac{g}{L} = \frac{\text{área}}{535839}$$

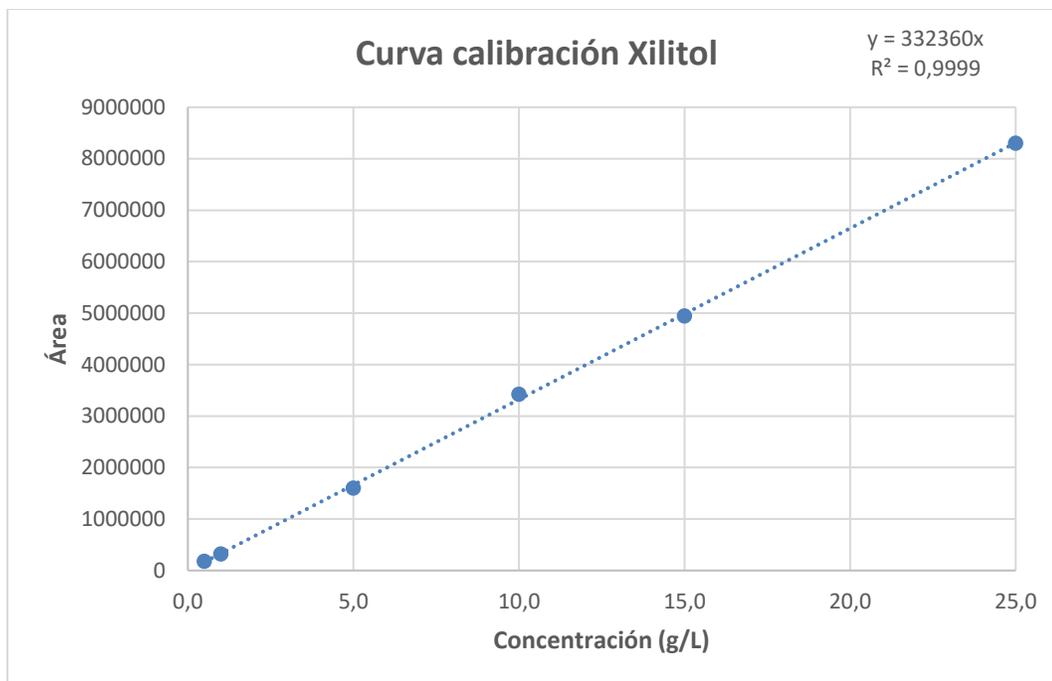
Xilosa					
Concentración	Tiempo Retención	Área	Promedio []	Promedio Área	Desviación estándar
0,5	9,721	267589	0,5	267628	43
0,5	9,720	267674			
0,5	9,714	267622			
1,0	9,718	517445	1,0	532654	15237
1,0	9,716	532600			
1,0	9,717	547918			
5,0	9,715	2576432	5,0	2607619	31099
5,0	9,717	2607796			
5,0	9,717	2638629			
10,0	9,717	5392547	10,0	5439378	46553
10,0	9,718	5439940			
10,0	9,716	5485648			
15,0	9,718	8075149	15,0	8050399	25030
15,0	9,718	8050950			
15,0	9,716	8025099			
25,0	9,727	13365590	25,0	13370341	4539
25,0	9,730	13370799			
25,0	9,732	13374634			



Modelo de ecuación para la determinación de arabinosa:

$$\text{arabinosa en } \frac{g}{L} = \frac{\text{área}}{309255}$$

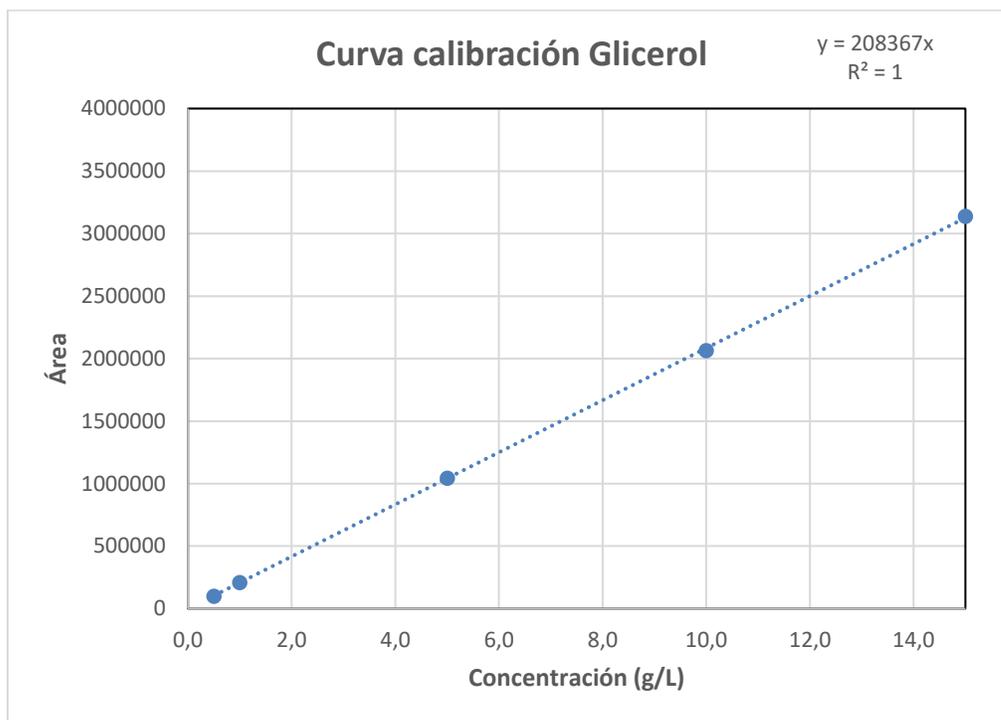
Arabinosa					
Concentración	Tiempo Retención	Área	Promedio []	Promedio Área	Desviación estándar
0,5	10,584	161833	0,5	156947	4883
0,5	10,579	156941			
0,5	10,575	152068			
1,0	10,578	295373	1,0	305743	10385
1,0	10,577	305714			
1,0	10,579	316142			
5,0	10,575	1478855	5,0	1493498	14550
5,0	10,579	1493684			
5,0	10,579	1507954			
10,0	10,579	3109381	10,0	3124845	15513
10,0	10,578	3124747			
10,0	10,578	3140406			
15,0	10,578	4637305	15,0	4633290	4090
15,0	10,578	4633436			
15,0	10,577	4629129			
25,0	10,588	7732752	25,0	7732419	1652
25,0	10,593	7733880			
25,0	10,592	7730626			



Modelo de ecuación para la determinación de xilitol:

$$\text{xilitol en } \frac{g}{L} = \frac{\text{área}}{332360}$$

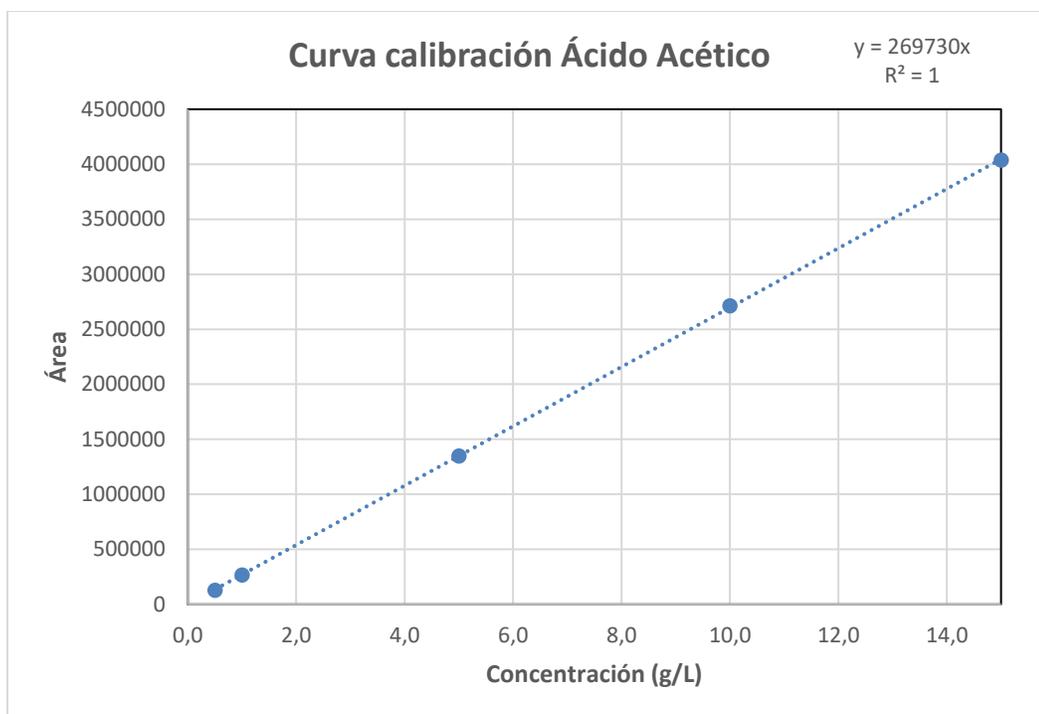
Xilitol					
Concentración	Tiempo Retención	Área	Promedio []	Promedio Área	Desviación estándar
0,5	11,087	190340	0,5	176475	13859
0,5	11,085	176464			
0,5	11,085	162622			
1,0	11,085	312823	1,0	322560	9732
1,0	11,085	322570			
1,0	11,084	332287			
5,0	11,083	1581038	5,0	1600534	19522
5,0	11,085	1600483			
5,0	11,088	1620082			
10,0	11,087	3308270	10,0	3421836	140854
10,0	11,87	3579451			
10,0	11,085	3377788			
15,0	11,085	4968450	15,0	4947586	20864
15,0	11,085	4947586			
15,0	11,085	4926722			
25,0	11,095	8289763	25,0	8304846	14961
25,0	11,098	8305093			
25,0	11,100	8319681			



Modelo de ecuación para la determinación de glicerol:

$$\text{glicerol en } \frac{g}{L} = \frac{\text{área}}{208367}$$

Glicerol					
Concentración	Tiempo Retención	Área	Promedio []	Promedio Área	Desviación estándar
0,5	13,292	100296	0,5	99880	421
0,5	13,299	99890			
0,5	13,302	99454			
1,0	13,300	208120	1,0	207959	175
1,0	13,304	207985			
1,0	13,303	207772			
5,0	13,307	1038650	5,0	1044087	5451
5,0	13,306	1044061			
5,0	13,306	1049551			
10,0	13,309	2047183	10,0	2064394	17981
10,0	13,301	2062941			
10,0	13,321	2083057			
15,0	13,307	3117338	15,0	3137767	20589
15,0	13,306	3137452			
15,0	13,309	3158512			

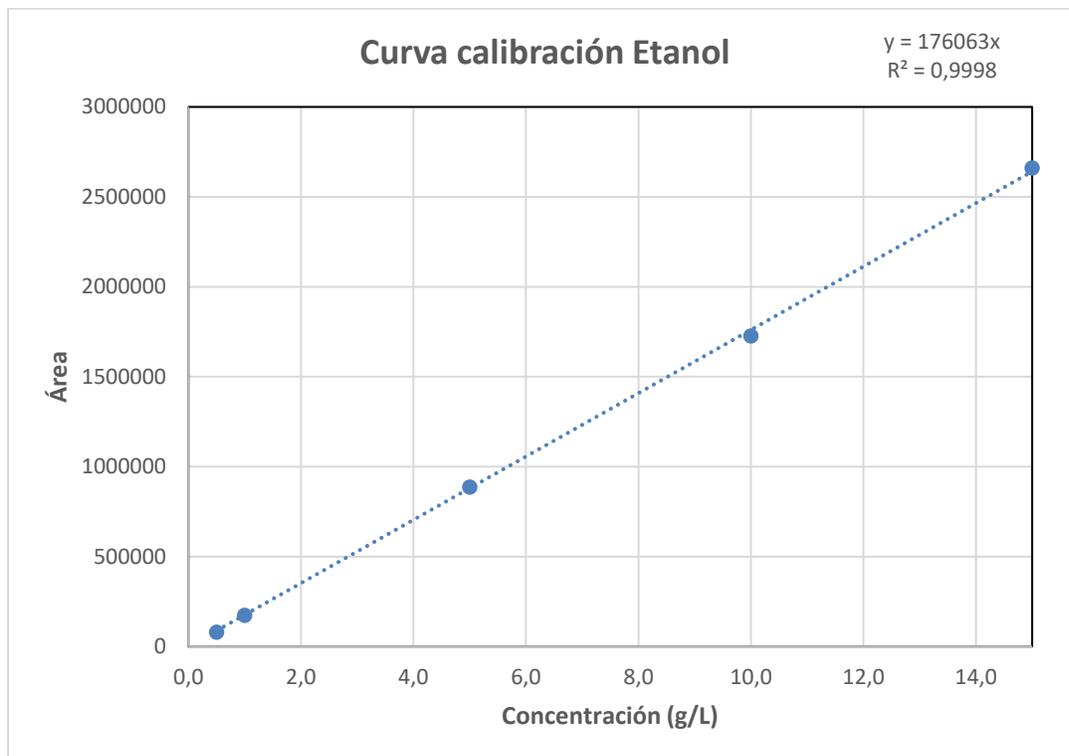


Modelo de ecuación para la determinación del ácido acético:

$$\text{glicerol en } \frac{g}{L} = \frac{\text{área}}{208367}$$

Ácido Acético					
Concentración	Tiempo Retención	Área	Promedio []	Promedio Área	Desviación estándar
0,5	15,109	126879	0,5	127795	919
0,5	15,107	127789			
0,5	15,107	128716			
1,0	15,095	263836	1,0	267093	3257
1,0	15,094	267093			
1,0	15,093	270349			
5,0	15,095	1340103	5,0	1348465	8317
5,0	15,097	1348554			
5,0	15,096	1356737			
10,0	15,085	2720678	10,0	2712787	7775
10,0	15,088	2712549			
10,0	15,095	2705134			
15,0	15,065	4008483	15,0	4036090	27518
15,0	15,066	4036268			

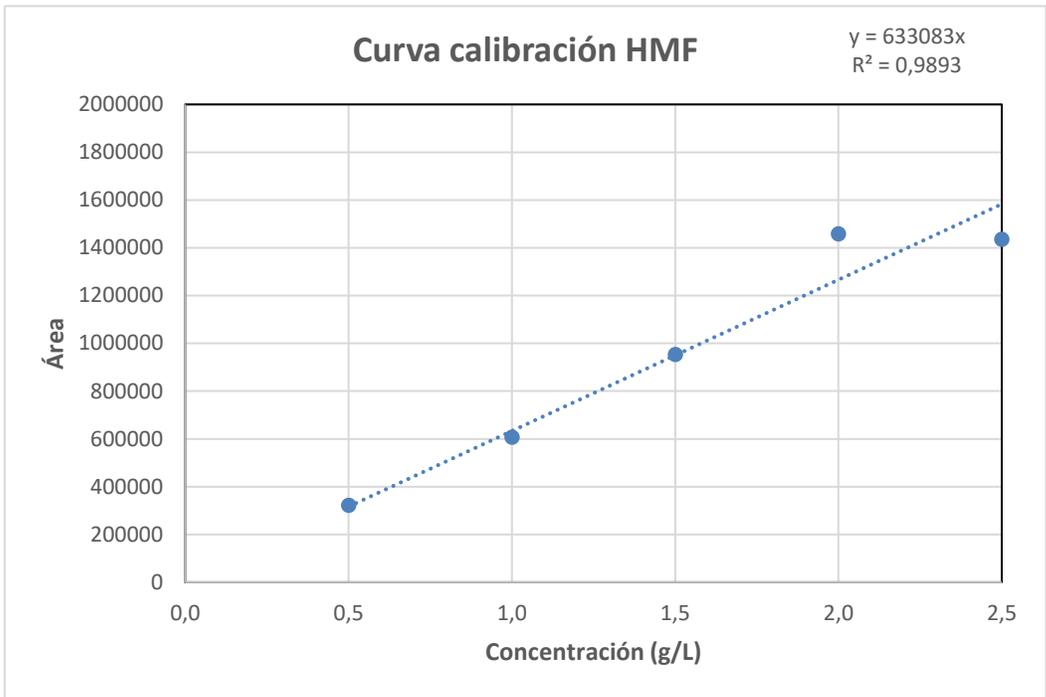
15,0	15,065	4063518			
------	--------	---------	--	--	--



$$\text{etanol en } \frac{g}{L} = \frac{\text{área}}{176063}$$

Etanol					
Concentración	Tiempo Retención	Área	Promedio []	Promedio Área	Desviación estándar
0,5	21,525	78202	0,5	79353	1119
0,5	21,580	79421			
0,5	21,579	80436			
1,0	21,569	175269	1,0	173263	2009
1,0	21,578	173269			
1,0	21,585	171251			
5,0	21,572	890838	5,0	887363	3305
5,0	21,550	886992			
5,0	21,555	884260			
10,0	21,561	1712146	10,0	1727558	15702
10,0	21,560	1726993			
10,0	21,580	1743535			

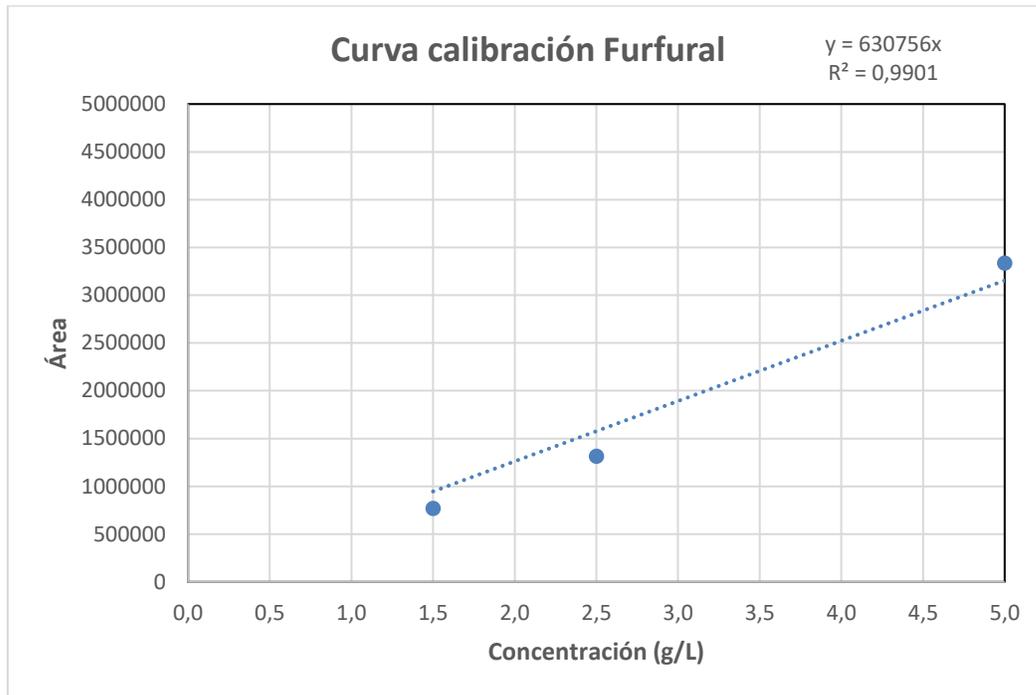
15,0	21,550	2672692	15,0	2661125	11934
15,0	21,565	2661827			
15,0	21,563	2648855			



$$\text{hidroximetilfurfural en } \frac{g}{L} = \frac{\text{área}}{176063}$$

5-Hidroximetilfurfural					
Concentración	Tiempo Retención	Área	Promedio []	Promedio Área	Desviación estándar
0,5	30,862	338573	0,5	322647,571	15787,8471
0,5	30,850	322,369			
0,5	30,921	307001			
1,0	30,946	576244	1,0	607746,029	31680,9913
1,0	30,921	607,391			
1,0	30,950	639603			
1,5	30,961	906883	1,5	954080,953	47161,5423
1,5	30,953	954,154			
1,5	30,939	1001206			
2,0	30,994	1266920	2,0	1458320,59	191644,464
2,0	30,970	1,457,834			
2,0	30,979	1650208			
2,5	31,039	1267433	2,5	1435224,02	167578,406
2,5	31,045	1,435,650			

2,5	31,025	1602589			
-----	--------	---------	--	--	--

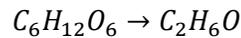


$$\text{furfural en } \frac{g}{L} = \frac{\text{área}}{630756}$$

Furfural					
Concentración	Tiempo Retención	Área	Promedio []	Promedio Área	Desviación estándar
1,5	46,976	770865	1,5	770951	98
1,5	46,963	770929			
1,5	46,954	771058			
2,5	46,978	1314602	2,5	1314322	576
2,5	46,950	1313660			
2,5	46,993	1314704			
5,0	46,674	3341414	5,0	3337616	6654
5,0	46,665	3329933			
5,0	46,980	3341502			

G. Anexo: Cálculo rendimientos y balances

- **Rendimiento de glucosa a etanol**



Los electrones disponibles de una molécula de glucosa y de etanol son:

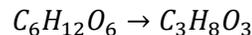
$$Ed_g \text{ (electrones disponibles glucosa)} = 6*(4) + 12*(1) + 6*(-2) = 24+12-12=24$$

$$Ed_e \text{ (electrones disponibles de etanol)} = 2*(4) + 6*(1) + 1*(-2) = 8+6-2=12$$

$$\text{Coeficiente molar} = \frac{24 \text{ edg}}{12 \text{ ede}} = 2 \text{ moles de etanol por 1 mol de glucosa}$$

$$\begin{aligned} \text{Coeficiente rendimiento masico máximo} &= \frac{24 \text{ edg}}{12 \text{ ede}} \times \frac{46,07 \frac{\text{g}}{\text{mol}} (\text{etanol})}{180,156 \text{ g/mol}} \\ &= 0,511 \text{ g de etanol por 1 g de glucosa} \end{aligned}$$

- **Rendimiento glucosa glicerol**



Los electrones disponibles de una molécula de glucosa y de glicerol son:

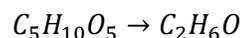
$$Ed_g \text{ (electrones disponibles glucosa)} = 6*(4) + 12*(1) + 6*(-2) = 24+12-12=24$$

$$Ed_{\text{glicerol}} \text{ (electrones disponibles de glicerol)} = 3*(4) + 8*(1) + 3*(-2) = 12+8-6=14$$

$$\text{Coeficiente molar} = \frac{24 \text{ edg}}{14 \text{ edglicerol}} = 1,714 \text{ moles de glicerol por 1 mol de glucosa}$$

$$\begin{aligned} \text{Coeficiente rendimiento masico máximo} &= \frac{24 \text{ edg}}{14 \text{ ede}} \times \frac{92,09 \frac{\text{g}}{\text{mol}} (\text{glicerol})}{180,156 \frac{\text{g}}{\text{mol}} (\text{glucosa})} \\ &= 0,876 \text{ g de glicerol por 1 g de glucosa} \end{aligned}$$

- **Rendimiento xilosa a etanol**



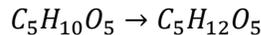
$$Ed_{\text{xilosa}} \text{ (electrones disponibles xilosa)} = 5*(4) + 10*(1) + 5*(-2) = 20+10-10=20$$

$$Ed_{\text{Etanol}} \text{ (electrones disponibles de etanol)} = 2*(4) + 6*(1) + 1*(-2) = 8+6-2=12$$

$$\text{Coeficiente molar} = \frac{20 \text{ edxilosa}}{12 \text{ ede}} = 1,666 \text{ moles de etanol por 1 mol de xilosa}$$

$$\begin{aligned} \text{Coeficiente rendimiento masico máximo} &= \frac{20 \text{ edxilosa}}{12 \text{ ede}} \times \frac{46,07 \frac{\text{g}}{\text{mol}} (\text{etanol})}{\frac{150,13 \text{ g}}{\text{mol}} (\text{xilosa})} \\ &= 0,511 \text{ g de etanol por 1 g de xilosa} \end{aligned}$$

- **Rendimiento xilosa a xilitol**



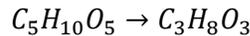
$$Ed_{\text{xilosa}} (\text{electrones disponibles xilosa}) = 5*(4) + 10*(1) + 5*(-2) = 20+10-10=20$$

$$Ed_{\text{xilitol}} (\text{electrones disponibles de xilitol}) = 5*(4) + 12*(1) + 5*(-2) = 20+12-10=22$$

$$\text{Coeficiente molar} = \frac{20 \text{ edxilosa}}{22 \text{ edxili}} = 0,909 \text{ moles de xilitol por 1 mol de xilosa}$$

$$\begin{aligned} \text{Coeficiente rendimiento masico máximo} &= \frac{20 \text{ edxilosa}}{22 \text{ edxili}} \times \frac{152,15 \frac{\text{g}}{\text{mol}} (\text{xilitol})}{\frac{150,13 \text{ g}}{\text{mol}} (\text{xilosa})} \\ &= 0,921 \text{ g de xilitol por 1 g de xilosa} \end{aligned}$$

- **Rendimiento xilosa a glicerol**



$$Ed_{\text{xilosa}} (\text{electrones disponibles xilosa}) = 5*(4) + 10*(1) + 5*(-2) = 20+10-10=20$$

$$Ed_{\text{glicerol}} (\text{electrones disponibles de glicerol}) = 3*(4) + 8*(1) + 3*(-2) = 12+8-6=14$$

$$\text{Coeficiente molar} = \frac{20 \text{ edxilo}}{14 \text{ edglice}} = 1,428 \text{ moles de glicerol por 1 mol de xilosa,}$$

$$\begin{aligned} \text{Coeficiente rendimiento masico máximo} &= \frac{20 \text{ edxilosa}}{14 \text{ edglicerol}} \times \frac{92,09 \frac{\text{g}}{\text{mol}} (\text{glicerol})}{\frac{150,13 \text{ g}}{\text{mol}} (\text{xilosa})} \\ &= 0,876 \text{ g de glicerol por 1 g de xilosa} \end{aligned}$$

H. Anexo: Resultados secuenciación ITS

ITS1 para 202-3

170705-020_G01_202-30_ITS1, ab1 1289

AGCAACGCAAACAGAACAAAAGCCGACGTTGGATTAATTGATGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTACTGGGCAAGAAGACAA
GAGATGGAGAGTCCAGCCGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGTAGGCTTGTAAAGTTCTTTCTTGTCTATTCCAAACGGTGAGA
GATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACACGTTTCAATACAACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGG
CATTGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAC
TGGAAATTTTAAAATATTAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAAT
GTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATCCAGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTC
ATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTTTGGAGTAACTTGAATTTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTC
CAAAGAGAGGTTTCTGCGTGCTTGAAGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGTTTGTACCAACTGCGGCGAATCTTTTTATACAG
AGCGTATTGGAACGTTATCGAAAAGAAGAAAGAGTCTAGTCGAGCAAGATCATAAAGATTGTTCTCCAATCTGTAGGATACGAGCTG
AACAAAACATATTGTATTCTAGAAAAGGGATCACTCAATCAAATTTAAAAATTTTAAAAATGGAATTTTTTTGTTTGGCAAGAAGCA
GGGAGAGCTTTTACGGGGCAAAAAACGAGAAAAAGGGAAAAAGTCCGCCGGGCTGGCGCTTAATGGCGCGATCTTGTAGGCT
GTAAGTTTTTTTTCTGCTATTCAAACGGTGGGAGAATTTCCGTTGCTTTGGTTATAGGAAAATTAACGTTTATACAACAACGGTGGG
AGTTTTCAAATCTTTCGACTTTTTCTTTGGGCATCCAGACATCGGGCAAAGGTACAACAAAACAATTTATTTTATTCTTTAAAGTT
TTGTTCAAACAAGGAATTCGTAACGTTGGGAAGTTGAAATATAAAAACTTACACGGAACCTGGCTTTCGCACCTAAAGAGCGCAAGT
GGGTCTATGTGAGTGCACTTGGGAATCGAACTTAAGAGCATTGGCCCCGGGTATTTCTCGAGAAGC

Total de pb 1289.

ITS4-202-3

170705-020_F02_202-30_ITS4, ab1 888

ACGAAGTAAAAATGAACGTAAGTCTTGGTTTGATATTGTGCGGTTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTCCAATACGCTCAG
TATAAAAAAGATTAGCCGAGTTGGTAAAACCTAAAACGACCGTACTTGCAATATACCTCAAGCACGCAGAGAAACCTCTTTGGG
AAAAAACATCCAATGAAAAGGCCAGCAATTTCAAGTAACTCAAAGAGTATCACTCACTACCAAACAGAATGTTTGAGAAGGAA
ATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATT
CACATTACGTATCGCATTTGCTGCTTCTTATCGATGCGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAATTTTTAAAAATTTCC
AGTTACGAAAATCTTGTTTTTGACAAAAATTAATGAATAAATAAAATTTGTTTGTGTTTGTACCTCTGGGCCCGATTGCTCGAAT
GCCCAAAGAAAAAGTTGCAAAGATATGAAAACCTCACAGTGTGTTGATTGAAACGGTTTTAATTGTCCTATAACAAAAGCACAGAA
ATCTCTACCGTTTGAATAGCAAGAAAGAACTTACAAGCCTAGCAAGACCGCGCACTTAAGCGCAGGCCCGGCTGGACTCTCCA
TCTCTTGTCTTCTTCCAGTAAAAGCTCTCATGCTCTTGC AAAACAAAAAATCCATTTTCAAATTTAATTTCTTTAATGATCC
TTCCGCATCTCCCTTTCAGAAAAAGGGGGAGGCCTCTTTGTATTGTGATAATCTCTCAGGAAGGAACATTTTGGTGTGTGCC
ACAAAAAGAGAGCT

Total de pb 888 pb.

I. Anexo: Análisis de varianza para determinar si el factor rendimiento de xilitol es significativo para las diferentes cepas de levaduras

Análisis de varianza de un factor: rendimiento xilitol para las cepas: *S. stipitis*, 202-3, 116-3, 116-5 y Q1 (Capítulo 2).

Todos los datos (cepas)	Tratamiento	Rendimiento Xilitol [g/g]
<i>S. stipitis</i>	1	0,178±0,002
202-3	2	0,233±0,004
116-3	3	0,227±0.006
116-5	4	0,216±0,005
Q1	5	0,000±0,001

Supuestos que debe cumplir el ANOVA:

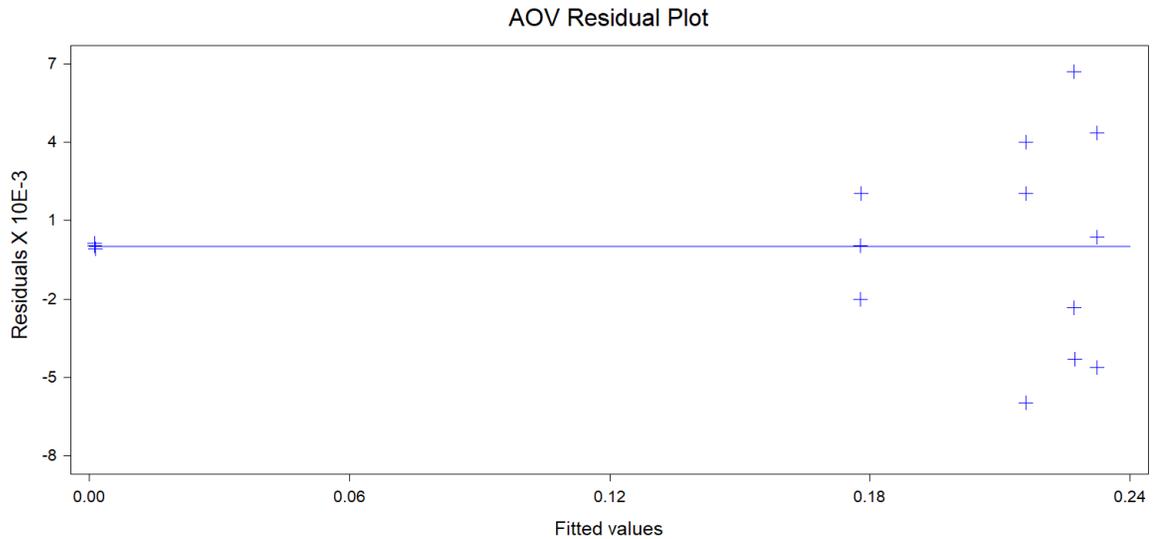
1. Independencia de errores experimentales

Se garantiza al hacer una adecuada aleatorización de los ensayos, por lo que se asume que los ensayos fueron montados de manera aleatoria para evitar interferencia de los diferentes tipos de error (equipos, operarios, materias primas, etc.).

2. Homogeneidad de varianzas

Se realiza la prueba de Levene:

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	12.7	4	0.0130
Cochran's Q	0.3961		
Largest Var / Smallest Var	3433.3		



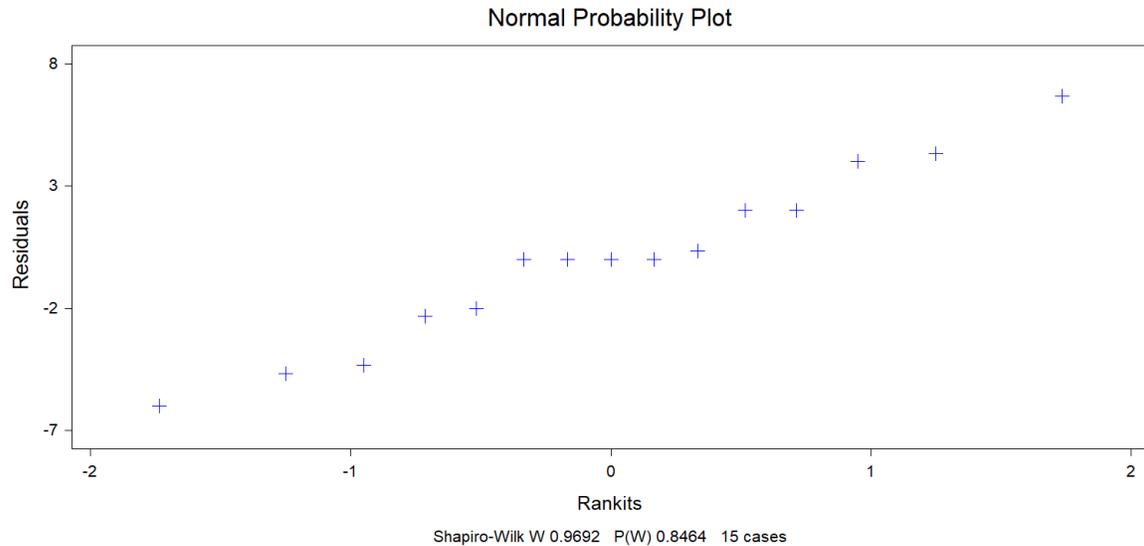
Se observa que, para la prueba de Levene, la probabilidad es menor de 0,05, por lo que se dice que las varianzas no son homogéneas y se requiere realizar algún tipo de transformación para que los datos puedan cumplir este supuesto. Esto se verifica a través del gráfico de residuales vs predichos donde se observa una forma de cono.

Por lo que se sugiere transformar los datos a una distribución en donde se pueda lograr la homogeneidad de varianzas, para ello se propone una transformación en raíz cuadrada de los datos [sq(yield)] y queda de la siguiente manera:

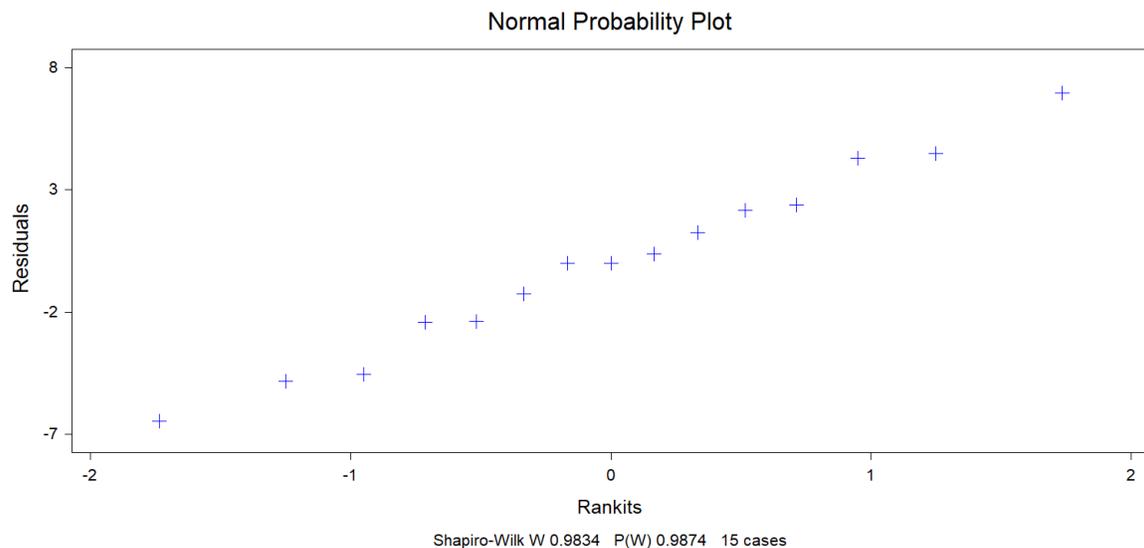
	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	4.28	4	0.3691
Cochran's Q	0.3783		
Largest Var / Smallest Var	23.987		

Con esta transformación se cumple con el supuesto de homogeneidad de varianzas ya que la probabilidad obtenida en la prueba de Levene es superior a 0,05.

3. Distribución normal de los datos



Con la prueba de verificación de normalidad de varianzas, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk que indica que los datos no siguen una distribución normal, por lo que los datos obtenidos no cumplirían este supuesto de normalidad. Se afirma esto ya que el valor calculado en la prueba de P (W) fue de 0,8464, un valor menor que el estadístico $W = 0,9692$. Se propone obtener este estadístico con la transformación de los datos a raíz cuadrada [Sq(Yield)]:



Para la prueba de S-W con los datos transformados se cumple que el valor calculado (0,9874) es mayor que el estadístico de S-W (0.9834) por lo que los datos transformados a raíz cuadrada [sq(Yield)] cumplen con el supuesto de normalidad.

Por último, el resumen del ANOVA es:

Completely Randomized AOV for Sqyield

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	4	0.43302	0.10826	5458	0.0000
Error	10	0.00020	0.00002		
Total	14	0.43322			

Con un valor $p < 0,05$, indicando una diferencia estadísticamente significativa entre los datos y rechazando la hipótesis nula ($H_0 \rightarrow u_1 = u_2 = u_3 = u_4 = u_5$).

Por lo que se realiza la prueba de Tukey para evaluar cual o cuales son los tratamientos diferentes y el resultado arrojado es:

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Sqyield by Treatment

Treatment	Mean	Homogeneous Groups
2	0.4823	A
3	0.4768	A
4	0.4647	B
1	0.4219	C
5	0.0400	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 3.636E-03
Critical Q Value 4.655 Critical Value for Comparison 0.0120
There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Indicando que los tratamientos 2 (cepa 202-3) y 3 (cepa 116-3) son iguales entre sí, pero diferentes al tratamiento 4 (116-5), al 1 (*S. stipitis*) y al 5 (Q1), siendo estos últimos también diferentes entre sí. Es decir que las cepas con los mejores rendimientos para xilitol son 2 (202-3) y 3 (116-3).

J. Anexo: Análisis de varianza para determinar si el factor rendimiento de xilitol es significativo en los tratamientos aerobio, microaerobio y anaerobio

Análisis de varianza de un factor: rendimiento xilitol para los tratamientos aerobio, microaerobio y anaerobio de la cepa 202-3 en medio Verduyn (Capítulo 2).

Todos los datos	Tratamiento	Rendimiento xilitol [g/g]
Aerobio	1	0,183±0,0050
Microaerobio	2	0,246±0,0035
Anaerobio	3	0,175±0,0040

Supuestos que debe cumplir el ANOVA:

1. Independencia de errores experimentales

Se garantiza al hacer una adecuada aleatorización de los ensayos, por lo que se asume que los ensayos fueron montados de manera aleatoria para evitar interferencia de los diferentes tipos de error (equipos, operarios, materias primas, etc.).

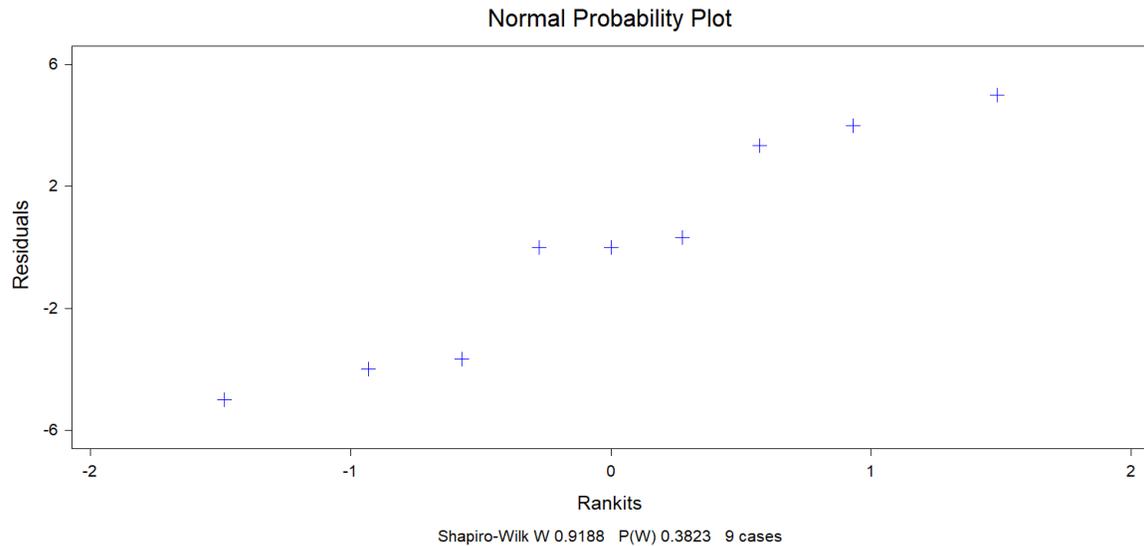
2. Homogeneidad de varianzas

Se cumple con el supuesto de homogeneidad de varianzas ya que al realizar la prueba de Barlett, arroja un p-value superior a 0,05.

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.21	2	0.8990

3. Distribución normal de los datos

No se cumple con el supuesto de normalidad, tampoco al transformar los datos a ln o a sq, por lo que se sugiere utilizar pruebas no paramétricas que omiten los supuestos anteriores y permiten analizar los datos.



Prueba realizada Kruskal-Wallis

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Yield by Treatment

Treatment	Mean Rank	Sample Size
1	4.7	3
2	8.0	3
3	2.3	3
Total	5.0	9

Kruskal-Wallis Statistic 6.4889
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0390

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	48.6667	24.3333	12.9	0.0067
Within	6	11.3333	1.8889		
Total	8	60.0000			

Total number of values that were tied 0
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 9 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of Yield by Treatment

Treatment	Mean	Homogeneous Groups
2	8.0000	A

1	4.6667	AB
3	2.3333	B

Alpha 0.05
Critical Z Value 2.394 Critical Value for Comparison 5.3531
There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.

Se observa que el tratamiento 2 (microaerobio) y 1 (aerobio) son iguales entre sí, el tratamiento 1 (aerobio) es igual al tratamiento 3 (anaerobio), por lo que se dice que el tratamiento con el mejor rendimiento es el 2 (Microaerobio).

K. Anexo: Protocolo transformación de levaduras

Protocolo (Gietz y Schiestl, 2007)

1. Inocular una colonia de la cepa de levadura con un asa bacteriológica desde un cultivo reciente en 5 mL de medio líquido YPD, Incubar durante toda la noche en un *shaker* rotatorio a 200 rpm a 30 °C, Se debe tener preparado un erlenmeyer con medio líquido 2xYPD.
2. Después de transcurridas 12 a 16 horas de crecimiento, determinar la concentración del cultivo de levadura, por espectrofotometría, Para esto, pipetear 10 µL de células en 1,0 mL de agua estéril en una cubeta de espectrofotometría, mezclarlo bien y medir la OD a 600 nm (una suspensión de 1×10^6 células/mL da una OD a 600 nm de 0,1), Multiplicar por el factor de dilución para determinar el título en el cultivo celular.
3. Añadir $2,5 \times 10^8$ células/mL al medio 2 x YPAD que ha estado precalentado, El título de esta solución debe ser 5×10^6 células/mL.
4. Incubar el frasco en el *shaker* a 30 °C y 200 rpm hasta que el título del cultivo sea al menos 2×10^7 células/mL, Esto puede tardar alrededor de 5 horas.
5. Desnaturalizar 1,0 mL de ADN donador en un baño hirviendo por 5 minutos y ponerlo en hielo inmediatamente, De manera alternativa, una muestra pre-desnaturalizada que estaba a -20 °C puede ser usada, descongelada y mantenida en hielo.
6. Colectar las células por centrifugación a 3000 g por 5 minutos y resuspender el *pellet* en 25 mL de agua estéril y centrifugar a 3000 g por 5 minutos a 20 °C, Repetir este procedimiento, resuspendiendo el *pellet* en 25 mL de agua estéril y centrifugando a 3000 g por 5 minutos, Resuspender finalmente las células en 1 mL de agua estéril.
7. Transferir la suspensión de células a un tubo de plástico de 2,0 o 1,5 mL, centrifugar por 30 s a 13.000 g y descartar el sobrenadante.
8. Resuspender las células en 1,0 mL de agua estéril y pipetear 100 µl de muestras conteniendo 1×10^8 células/mL, cada una en un tubo diferente, para cada evento de transformación, Centrifugar a 13.000 g por 30 segundos y remover el sobrenadante.

9. Para un plásmido o fragmento de ADN a transformar, se sigue el esquema de reacción mostrado en la Tabla 5-1.

Tabla 5-1 – Mezcla transformación método químico.

Componente de transformación	Cantidad (μL) 1 transformación (1x)
PEG 3350 (50% (w/v))	240
LiAc 1,0 M	36
ADN esperma salmón (2,0 mg/mL)	50
ADN plasmídico	20
Agua estéril	14
Volumen total	360

Es importante realizar la mezcla de reacción de acuerdo con el número de transformaciones que se van a realizar, además de un control negativo.

Añadir 360 μL de la mezcla de transformación a cada tubo y resuspender las células con vórtex vigoroso.

9. Poner los tubos en un baño a 42 °C e incubar por 60 minutos (este tiempo puede variar para cada cepa).

10. Centrifugar los tubos a 13000 g por 30 segundos y remover el sobrenadante con una micropipeta.

11. Pipetear 1,0 mL de medio YPD líquido sin antibiótico o marcador de selección en cada tubo de transformación, Poner en vórtex para resuspender el *pellet*.

12. Incubar por 2–3 h a 30 °C para asegurarse de una buena expresión del plásmido o fragmento de ADN introducido.

11. Colocar 200 μL de la suspensión celular en las cajas con medio YPD preparadas con el antibiótico de selección usado o el agente de selección.

12. Incubar las cajas a 30 °C por 3 a 4 días y determinar el número de transformantes y la eficiencia de transformación.

Materiales y reactivos (Daniel Gietz y Schiestl, 2007)

Solución de lisis alcalina I

50 mM glucosa

25 mM Tris-Cl (pH 8,0)

10mM EDTA (pH 8,0)

Preparar la solución I para *stocks* de 100 mL, esterilizar por calor 15 minutos a 103 kPa en ciclo líquido y almacenarlos a 4 °C.

Solución de lisis alcalina II

0,2 N de NaOH (diluida fresca de un *stock* 10N)

1% (w/v) SDS

Prepare la solución fresca y consérvela a temperatura ambiente.

Solución de lisis alcalina III (Tabla 10)

Tabla 5-2 – Preparación solución de lisis III

5 M de acetato de potasio	60 mL
H ₂ O	11,5 mL
Ácido acético glacial	28,5 mL
Volumen final	100 mL

La solución resultante es 3M con respecto al acetato de potasio y 5M con respecto al acetato, Conserve la solución a 4 °C y transfiera a un recipiente con hielo antes de su uso.

Solución STE

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

0,1 M NaCl

1 mM EDTA (pH 8,0)

Preparar la solución STE para stocks de 100 mL y esterilizar por calor 15 minutos a 103 kPa en ciclo líquido y almacenarlos a 4 °C.

Antibiótico para la selección de los transformantes, por ejemplo, ampicilina en concentración 100 µg/mL en el medio final, ya sea sólido con agar o líquido.

Etanol al 70% y etanol absoluto grado biología molecular.

Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) grado biología molecular.

Preparación Tris-Cl (1 M)

Disolver 121,1 g de Tris base en 800 mL de H₂O, Ajustar el pH al valor deseado añadiendo HCl concentrado (Tabla 5-3).

Tabla 5-3 – Preparación Tris-Cl,

pH	HCl
7,4	70 mL
7,6	60 mL
8,0	42 mL

Dejar que la solución se enfríe a temperatura ambiente antes de realizar los ajustes finales de pH, Ajustar el volumen de la solución a 1 L añadiendo H₂O. Alícuotar y esterilizar.

Nota: Si la solución 1M se torna de color amarillo, descartar y obtener Tris base de mejor calidad, El pH es dependiente de la temperatura y decrece 0,03 unidades por cada grado centígrado aumentado.

Buffer TE

10x Tris EDTA (TE)

pH 7,4

100 mM Tris-Cl (pH 7,4)

10 mM EDTA (pH 8,0)

pH 7,6

100 mM Tris-Cl (pH 7,6)

10 mM EDTA (pH 8,0)

pH 8,0

100 mM Tris-Cl (pH 8,0)

10 mM EDTA (pH 8,0)

Esterilizar las soluciones por calor 20 minutos a 103 kPa en ciclo líquido, Almacenar la solución *buffer* a temperatura ambiente.

Preparación solución EDTA

Añadir 186,1 g de EDTA a 800 mL de agua, Agitar vigorosamente con un agitador magnético, Ajustar el pH a 8,0 con NaOH (aproximadamente 20 g de *pellets* de NaOH), Dispensar en alícuotas y esterilizar por vapor. La sal di sódica de EDTA no se disolverá hasta que el pH se ajuste a 8,0 por la adición de NaOH.

Preparación solución NaOH 5 M

Tener precaución porque involucra una reacción altamente exotérmica. Prepararla en un contenedor de plástico, A 800 mL de H₂O añadir 200 g de *pellets* de NaOH, con agitación continua. Como precaución poner la solución en hielo. Una vez que los *pellets* se hayan disuelto completamente, ajustar el volumen a 1 L con agua. Almacenar la solución en un contenedor plástico a temperatura ambiente. No es necesaria esterilización.

Preparación SDS (20% p/v)

Disolver 200 g de SDS (Sulfato Lauril de Sodio) de grado electroforesis en 900 mL de agua destilada. Calentar a 68 °C con agitación magnética para disolver. Si es necesario, ajustar

el pH a 7,2 añadiendo algunas gotas de HCl concentrado. Ajustar el volumen a 1 L con agua. Almacenar a temperatura ambiente. No es necesario esterilizar, no autoclavar.

Medio YPD

El medio YPD contiene 1% p/v bacto-extracto de levadura, 2% p/v bacto-peptona, 18 g/l bacto-agar para medio sólido. Las células de levadura que son transformadas pueden ser puestas a crecer normalmente por dos generaciones en medio líquido 2xYPD 2% p/v bacto-extracto de levadura, 4% p/v bacto-peptona, 4% glucosa. El medio es preparado y autoclavado por 15 minutos a 121 °C.

Antibiótico de selección

El medio YPAD con agar para la selección de los transformantes, puede ser complementado por ejemplo con geneticina (G418 – Sigma-Aldrich) en concentración final 200 µg/mL u otro antibiótico de interés. Se prepara desde un *stock* previo y se agrega al medio YPD.

Acetato de Litio (1,0 M)

Se disuelven 10,2 g de Acetato de Litio dihidratado en 100 mL de agua y autoclavar por 15 minutos. Se almacena a temperatura ambiente. También puede ser esterilizado por filtración.

PEG MW 3350 (50 %p/p)

Añadir 50 g de PEG 3350 a 30 mL de agua desionizada destilada en un *beaker* de 150 mL, Agitar hasta disolver toda la solución. Llevar a 100 mL y autoclavar por 15 minutos, También puede ser filtrada, El PEG puede ser almacenado a temperatura ambiente. La botella donde está almacenado debe ser cerrada apropiadamente para prevenir su evaporación, la cual puede incrementar la concentración de PEG en la reacción de transformación y reducir la eficiencia de esta.

ADN portador de cadena sencilla (SS-DNA)

Disolver 200 mg de ADN de esperma de salmón en 100 mL de TE estéril (10 mM Tris-HCl, 1mM Na₂EDTA pH 8,0), usando un agitador magnético a 4 °C. Esto puede tomar incluso algunas horas. Puede ayudarse pipeteando. Realizar alícuotas en 20 muestras de 1 mL en tubos de 1,5 mL y el restante ponerlo en tubo de 15 mL y almacenarlo a -20 °C.

Desnaturalizar el ADN en un baño de agua hirviendo por 5 minutos e inmediatamente ponerlo en hielo antes de su uso. El ADN puede ser desnaturalizado tres o cuatro veces sin pérdida de su integridad.

L. Anexo: Análisis de varianza para determinar si el factor rendimiento de xilitol es significativo para las cepas 202-3, R1-MAPL, R2-MAPL y B2G-MAPL

Análisis de varianza de un factor: rendimiento xilitol para las cepas 202-3, R1-MAPL, R2-MAPL y B2G-MAPL (Capítulo 3).

Todos los datos	Tratamiento	Rendimiento xilitol [g/g]
202-3	1	0,171±0,001
R1-MAPL	2	0,302±0,001
R2-MAPL	3	0,374±0,001
B2G-MAPL	4	0,407±0,003

1. Independencia de errores experimentales

Se garantiza al hacer una adecuada aleatorización de los ensayos, por lo que se asume que los ensayos fueron montados de manera aleatoria para evitar interferencia de los diferentes tipos de error (equipos, operarios, materias primas, etc.).

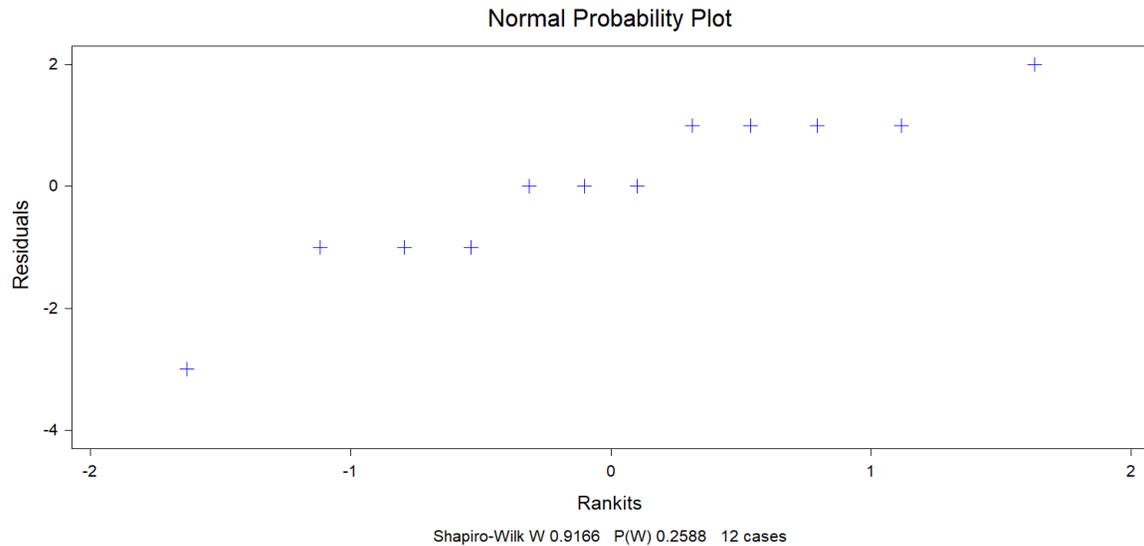
2. Homogeneidad de varianzas

Se cumple con el supuesto de homogeneidad de varianzas ya que al realizar la prueba de Barlet, arroja un p-value superior a 0,05.

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	2.85	3	0.4160

3. Distribución normal de los datos

No se cumple con el supuesto de normalidad, tampoco al transformar los datos a ln o a sq, por lo que se sugiere utilizar pruebas no paramétricas que omiten los supuestos anteriores y permiten analizar los datos.



Por lo que se realiza la prueba de Kruskal-Wallis:

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Yield by Treatment

Treatment	Mean Rank	Sample Size
1	2.0	3
2	5.0	3
3	8.0	3
4	11.0	3
Total	6.5	12

Kruskal-Wallis Statistic 10.3846
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0156

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	135.000	45.0000	45.0	0.0000
Within	8	8.000	1.0000		
Total	11	143.000			

Total number of values that were tied 0
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 12 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of Yield by Treatment

Treatment	Mean	Homogeneous Groups
-----------	------	--------------------

4	11.000	A
3	8.0000	AB
2	5.0000	AB
1	2.0000	B

Alpha 0.05

Critical Z Value 2.638 Critical Value for Comparison 7.7668

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

En este caso se encuentra que hay diferencias entre las cepas evaluadas, siendo que la cepa B2G-MAPL (tratamiento 4) la que mejores rendimientos presenta, seguido de las cepas R2-MAPL (tratamientos 3) y R1-MAPL (tratamiento 2).

M. Anexo: Análisis de varianza para determinar si el factor rendimiento de xilitol es significativo para las cepas 202-38, R2-MAPL8 y B2G-MAPL8

Análisis de varianza de un factor: rendimiento xilitol para las cepas 202-3-MA8, R1-MAPL, R2-MAPL y B2G-MAPL (Capítulo 3).

Todos los datos	Tratamiento	Rendimiento xilitol [g/g]
202-3-MA8	1	0,373±0,001
R2-MAPL8	2	0,736±0,003
B2G-MAPL8	3	0,869±0,002

1. Independencia de errores experimentales

Se garantiza al hacer una adecuada aleatorización de los ensayos, por lo que se asume que los ensayos fueron montados de manera aleatoria para evitar interferencia de los diferentes tipos de error (equipos, operarios, materias primas, etc.).

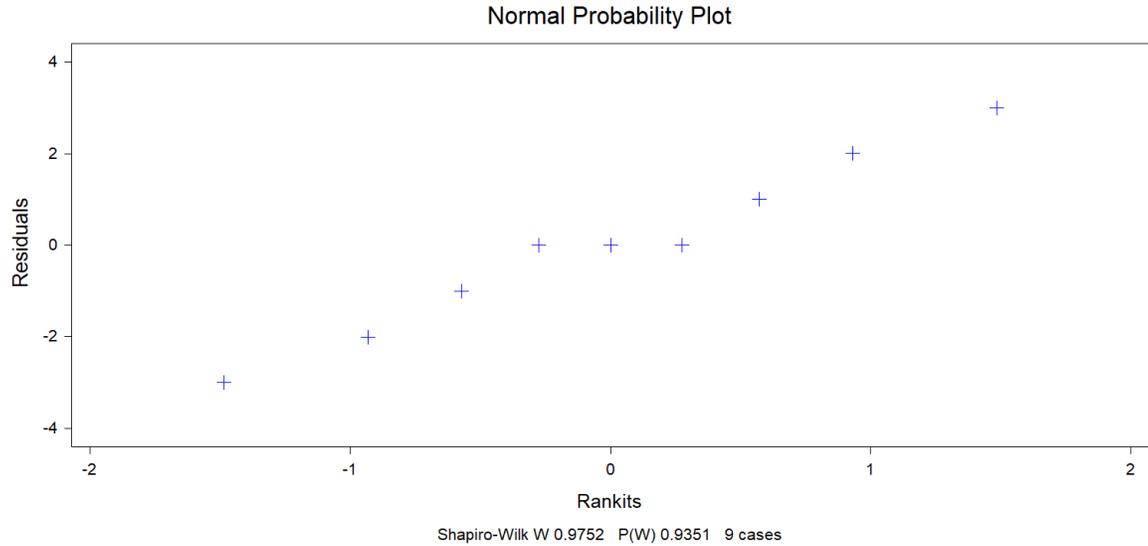
2. Homogeneidad de varianzas

Se cumple con el supuesto de homogeneidad de varianzas al tener un p-valor mayor de 0,05 en la prueba de Barlett.

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	1.70	2	0.4278

3. Distribución normal de los datos

En la prueba de Shapiro-Wilk para verificación del supuesto de normalidad se encuentra que no se cumple con este supuesto.



Nuevamente, se realiza la prueba de Kruskal-Wallis:

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Yield by Treatment

Treatment	Mean Rank	Sample Size
1	2.0	3
2	5.0	3
3	8.0	3
Total	5.0	9

Kruskal-Wallis Statistic 7.2000
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0273

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	54.0000	27.0000	27.0	0.0010
Within	6	6.0000	1.0000		
Total	8	60.0000			

Total number of values that were tied 0
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 9 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of Yield by Treatment

Treatment	Mean	Homogeneous Groups
3	8.0000	A
2	5.0000	AB
1	2.0000	B

Alpha 0.05
Critical Z Value 2.394 Critical Value for Comparison 5.3531
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Se encuentra que la cepa B2G-MAPL8 (tratamiento 3) es la que presenta los mejores rendimientos de xilitol seguido de la cepa R2-MAPL8 (tratamiento 2) y la cepa 202-3-MA8 (tratamiento 1).

N. Anexo: Productos tesis

Artículos publicados

1. Patiño MA, Ortiz JP, Velásquez M, Stambuk BU, D-Xylose consumption by nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Yeast*, 2019; 36:541–556, <https://doi.org/10.1002/yea.3429>

Artículos en preparación

2. Xylose metabolismation by *Saccharomyces cerevisiae* isolated in Colombia.
3. Genetic improvement of a *S. cerevisiae* strain for increasing xylitol production.

Otras publicaciones y trabajos presentados en congresos:

4. Patiño MA, Wloch-Salamon D., Sherlock G. Stambuk B. Evolutionary engineering of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells for improved xylose fermentation. PYFF6 - 6th Conference on Physiology of Yeasts and Filamentous Fungi. Lisboa-Portugal. 2016. ISBN: 978-989-20-6736-0.
5. Patiño MA, Ugarte Stambuk B. Ingeniería genética en una levadura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante de origen industrial para la fermentación de xilosa. C2B2 - Segundo Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular. Medellín-Colombia. 2016. ISBN 978-958-59491-1-9.
6. Patiño MA, Stambuk, B, Velásquez, M. Levadura aislada en territorio colombiano con potencial para la producción de etanol. Primer Simposio de Investigación de Posgrados en Biotecnología. Bogotá-Colombia. 2017. e-ISSN 2619-4503. Ganador presentación oral área Industrial – Bioprocesos.
7. Patiño MA, Ortiz JP, Basso T, Velásquez M, Stambuk BU. Colombian native *Saccharomyces cerevisiae* able to metabolize xylose. International Specialized Symposium on Yeast ISSY34-Bariloche-Argentina. 2018.
8. Patiño MA, Romero D, Puentes N, Stambuk B, Velásquez M. *Saccharomyces cerevisiae* aislada en Colombia para la producción de alcoholes a partir de xilosa. 30 Congreso Colombiano de Ingeniería Química – ACIQ. Bogotá-Colombia. 2020.
9. Patiño MA, Romero D, Puentes N, Stambuk B, Velásquez M. Silenciamiento del gen *GAL80* en aislado natural de levadura aumenta la producción de xilitol. X Congreso Latinoamericano de Micología-Chile. 2020.
10. Patiño MA, Stambuk, B, Velásquez, M. Ingeniería evolutiva en levaduras salvajes y recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* mejora la producción de xilitol. 2do Simposio Virtual de Estudiantes y Egresados en Biotecnología y áreas afines-Bogotá-2020.
11. Patiño MA, Stambuk, B, Velásquez, M. Caracterização fenotípica e engenharia genômica de uma cepa *Saccharomyces cerevisiae* consumidora de xilose isolada na Colômbia. 1st International, 2nd Regional and 11th Undergraduate Colloquium on Basic and Applied Microbiology: Beyond the Microworld. Universidad de Antioquia. 2021.

Participación en proyectos

1. Ingeniería genética de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para aumentar la producción de alcoholes a partir de mieles y sustratos lignocelulósicos. Proyecto de investigación, Código: 35970, Código QUIPU: 202010025993. Convocatoria nacional de proyectos para el fortalecimiento de la investigación, creación e innovación de la Universidad Nacional de Colombia 2016-2018. Finalizado.
2. Mejoramiento genético de una levadura *Saccharomyces cerevisiae* aislada en territorio colombiano para la fermentación de xilosa. Proyecto de investigación, Código: 40811, Código QUIPU: 201010028194. Convocatoria nacional para el apoyo al desarrollo de tesis de posgrado o de trabajos finales de especialidades en el área de la salud de la Universidad Nacional de Colombia 2017-2018. Finalizado.
3. Mejoramiento genético de una levadura *Saccharomyces cerevisiae* aislada en territorio colombiano para la fermentación de xilosa. Proyecto de investigación, Código: 49997, Código QUIPU: 202010026975. Convocatoria para el apoyo al desarrollo de tesis de Doctorado de la Facultad de Ciencias sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia 2020. Activo.
4. CONTRATO MARCO DE ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS Y SUS PRODUCTOS DERIVADOS No. 121. De 2016 – Otrosí No 8 de 2018 – RGE-152-8. PROYECTO: Producción de alcoholes empleando cepas nativas de levaduras colombianas. Activo.

Participación en evaluación de trabajos

Patiño MA. 26º SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade de São Paulo. Evaluador.

Patiño MA, 18a Feira Brasileira de Ciências e Engenharia-FEBRACE. 2019. Comisión de pre-evaluación.

Patiño MA, 18a Feira Brasileira de Ciências e Engenharia-FEBRACE. 2020. Comisión de evaluación.

Organización de eventos

Patiño MA. Primer Coloquio Colombiano de Micología – Historia de la micología en Colombia y sus protagonistas. 2020.

Orientación de estudiantes

Diego Hernando Romero Roa y Nicolás Puentes Urrego. Iniciación científica en el laboratorio de Bioprocesos del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Universidad Nacional de Colombia. 2020.

Camilo Andrés Carrillo Murcia, Jairo Leonardo Yepes Álvarez, Nicolás Puentes Urrego, Esteban Forero Castañeda, Néstor Alfonso Quintero Rodríguez y Sergio Esteban Meneses Díaz (Q. E. P. D). Proyecto de investigación para la materia Introducción a la Ingeniería Química.

Cursos realizados

Introdução às técnicas de RNAi e CRISPR. Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Riberão Preto (FFCLRP) Universidade de São Paulo. 2018.

Our Energy Future. Curso virtual. University of California San Diego. 2020.

Pasantía Doctoral Internacional

Laboratório de Biotecnologia. Grupo de Engenharia de Bioprocessos – GEnBIO. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Supervisor: Professor Doutor Thiago Olitta Basso. 2018.

Bibliografía

Ahmad, Irshad, Woo Yong Shim, y Jung-Hoe Kim. 2012. «Enhancement of xylitol production in glycerol kinase disrupted *Candida tropicalis* by co-expression of three genes involved in glycerol metabolic pathway». *Bioprocess and Biosystems Engineering* 36 (9): 1279-84. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0872-4>

Alonso, A., y A. Kotyk. 1978. «Apparent half-lives of sugar transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*». *Folia Microbiologica* 23 (2): 118-25. <https://doi.org/10.1007/BF02915311>

Arora, Anju, Shweta Priya, Pankhuri Sharma, Shalley Sharma, y Lata Nain. 2016. «Evaluating biological pretreatment as a feasible methodology for ethanol production from paddy straw». *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 8 (octubre): 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.08.006>

Attfield, Paul V., y Philip J. L. Bell. 2006. «Use of population genetics to derive nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains that grow using xylose as a sole carbon source». *FEMS Yeast Research* 6 (6): 862-68. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00098.x>

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, y K. Struhl. 1992. *Short Protocols in Molecular Biology*. 2nd ed. John Wiley & Sons

Bamba, Takahiro, Tomohisa Hasunuma, y Akihiko Kondo. 2016. «Disruption of PHO13 improves ethanol production via the xylose isomerase pathway». *AMB Express* 6 (1): 4. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0175-7>

Barnett, J. A., R. W Payne, y D Yarrow. 1990. *Yeasts : Characteristics and Identification*. 2nd ed. Cambridge ; New York : Cambridge University Press. <https://trove.nla.gov.au/version/6557753>

Basso, L. C., H. V. de Amorim, A. J. de Oliveira, y M. L. Lopes. 2008. «Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil». *FEMS Yeast Research* 8 (7): 1155-63. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x>

Batt, C. A., S. Carvallo, D. D. Easson, M. Akedo, y A. J. Sinskey. 1986. «Direct evidence for a xylose metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*». *Biotechnology and Bioengineering* 28 (4): 549-53. <https://doi.org/10.1002/bit.260280411>

- Belinchón, Mónica M., y Juana M. Gancedo. 2003. «Xylose and some non-sugar carbon sources cause catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*». *Archives of Microbiology* 180 (4): 293-97. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0593-9>
- Bengtsson, Oskar, Marie Jeppsson, Marco Sonderegger, Nadia Skorupa Parachin, Uwe Sauer, Bärbel Hahn-Hägerdal, y Marie-F. Gorwa-Grauslund. 2008. «Identification of common traits in improved xylose-growing *Saccharomyces cerevisiae* for inverse metabolic engineering». *Yeast (Chichester, England)* 25 (11): 835-47. <https://doi.org/10.1002/yea.1638>
- Benson, Dennis A., Ilene Karsch-Mizrachi, David J. Lipman, James Ostell, y David L. Wheeler. 2003. «GenBank». *Nucleic Acids Research* 31 (1): 23-27
- Bergdahl, Basti, Anders G. Sandström, Celina Borgström, Tarinee Boonyawan, Ed W. J. van Niel, y Marie F. Gorwa-Grauslund. 2013. «Engineering yeast Hexokinase 2 for improved tolerance toward xylose-induced inactivation». *PLoS ONE* 8 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075055>
- Bertilsson, M., J. Andersson, y G. Lidén. 2008. «Modeling simultaneous glucose and xylose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* from kinetics and gene expression of sugar transporters». *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31 (4): 369-77. <https://doi.org/10.1007/s00449-007-0169-1>
- Bhukya, Bhima, Srinivas Banoth, y Archana Anthappagudem. 2019. «Chapter 5 - *Saccharomyces cerevisiae* as potential probiotic: strategies for isolation and selection». En *Applied Microbiology and Bioengineering*, editado por Pratyosh Shukla, 71-85. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815407-6.00005-8>
- Bisson, L. F., y D. G. Fraenkel. 1983. «Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (6): 1730-34. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.6.1730>
- Bisson, Linda F., Qingwen Fan, y Gordon A. Walker. 2016. «Sugar and glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 892: 125-68. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6_6
- Boles, E., y C. P. Hollenberg. 1997. «The Molecular genetics of hexose transport in yeasts». *FEMS Microbiology Reviews* 21 (1): 85-111. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00346.x>
- Borneman, Anthony R., Brian A. Desany, David Riches, Jason P. Affourtit, Angus H. Forgan, Isak S. Pretorius, Michael Egholm, y Paul J. Chambers. 2012. «The genome sequence of the wine yeast VIN7 reveals an allotriploid hybrid genome with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* Origins». *FEMS Yeast Research* 12 (1): 88-96. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00773.x>

- Bradbury, John E., Keith D. Richards, Heather A. Niederer, Soon A. Lee, P. Rod Dunbar, y Richard C. Gardner. 2006. «A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains». *Antonie Van Leeuwenhoek* 89 (1): 27-37. <https://doi.org/10.1007/s10482-005-9006-1>
- Brink, Daniel P., Celina Borgström, Felipe G. Tueros, y Marie F. Gorwa-Grauslund. 2016. «Real-Time monitoring of the sugar sensing in *Saccharomyces cerevisiae* indicates endogenous mechanisms for xylose signaling». *Microbial Cell Factories* 15 (1): 183. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0580-x>
- Bruinenberg, P. M., P. H. M. de Bot, J. Dijken, y W. A. Scheffers. 1984. «NADH-Linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts». *Applied Microbiology and Biotechnology* 19 (4): 256-60. <https://doi.org/10.1007/BF00251847>
- Buziol, Stefan, Jessica Becker, Anja Baumeister, Susanne Jung, Klaus Mauch, Matthias Reuss, y Eckhard Boles. 2002. «Determination of in vivo kinetics of the starvation-induced Hxt5 Glucose Transporter of *Saccharomyces cerevisiae*». *FEMS Yeast Research* 2 (3): 283-91. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00113-7](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00113-7)
- Cadete, Raquel M., Alejandro M. de Las Heras, Anders G. Sandström, Carla Ferreira, Francisco Gírio, Marie-Françoise Gorwa-Grauslund, Carlos A. Rosa, y César Fonseca. 2016. «Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* Species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*». *Biotechnology for Biofuels* 9: 167. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0570-6>
- Carlson, M. 1999. «Glucose repression in yeast». *Current Opinion in Microbiology* 2 (2): 202-7. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80035-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80035-6)
- Carvalho, Walter, Marcio A. Batista, Larissa Canilha, Julio C. Santos, Attilio Converti, y Silvio S. Silva. 2004. «Sugarcane bagasse hydrolysis with phosphoric and sulfuric acids and hydrolysate detoxification for xylitol production». *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 79 (11): 1308-12. <https://doi.org/10.1002/jctb.1131>
- Chang, Sue-Feng, y Nancy W. Y. Ho. 1988. «Cloning the yeast xylulokinase gene for the improvement of xylose fermentation». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 17 (1): 313-18. <https://doi.org/10.1007/BF02779165>
- Cheng, Cheng, Rui-Qi Tang, Liang Xiong, Ronald E. Hector, Feng-Wu Bai, y Xin-Qing Zhao. 2018. «Association of improved oxidative stress tolerance and alleviation of glucose repression with superior xylose-utilization capability by a natural isolate of *Saccharomyces cerevisiae*». *Biotechnology for Biofuels* 11: 28. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1018-y>

- Chiang, C., y S. G. Knight. 1959. «D-xylose metabolism by cell-free extracts of *Penicillium chrysogenum*». *Biochimica Et Biophysica Acta* 35: 454-63
- Chiang, Lin-Chang, Cheng-Shung Gong, Li-Fu Chen, y George T. Tsao. 1981. «D-xylulose fermentation to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*». *Applied and Environmental Microbiology* 42 (2): 284-89
- Cid, Angel, Carlos Gancedo, y Rosario Lagunas. 1987. «Inactivation of the glucose transport system in sporulating yeast». *FEMS Microbiology Letters* 41 (1): 59-61
- Cifuentes, Y. A. 2016. «Secuenciación y caracterización del genoma de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* 202-3 con potencial para la producción de etanol de segunda generación». Universidad Nacional de Colombia
- Cifuentes, Yina, Sergio Latorre, Andrés Pinzón, y Mario Velásquez. 2015. «Draft genome sequence of a natural isolated *Saccharomyces cerevisiae* from Colombia». En *2015 IEEE 5th International Conference on Computational Advances in Bio and Medical Sciences (ICCABS)*, 1-2. <https://doi.org/10.1109/ICCABS.2015.7344727>
- Coelho, Marco A., Carla Gonçalves, José Paulo Sampaio, y Paula Gonçalves. 2013. «Extensive intra-kingdom horizontal gene transfer converging on a fungal fructose transporter gene». *PLOS Genetics* 9 (6): e1003587. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003587>
- Dário, M. G. 2012. «Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*.» Text, Universidade de São Paulo. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-04062012-114632/>
- De Bari, Isabella, Daniela Cuna, Vincenzo Di Matteo, y Federico Liuzzi. 2014. «Bioethanol production from steam-pretreated corn stover through an isomerase mediated process». *New Biotechnology* 31 (2): 185-95. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.12.003>
- DelaFuente, G. 1970. «Specific inactivation of yeast hexokinase induced by xylose in the presence of a phosphoryl donor substrate». *European Journal of Biochemistry* 16 (2): 240-43. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1970.tb01077.x>
- Della-Bianca, Bianca Eli, Thiago Olitta Basso, Boris Ugarte Stambuk, Luiz Carlos Basso, y Andreas Karoly Gombert. 2013. «What do we know about the yeast strains from the brazilian fuel ethanol industry? ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (3): 979-91. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4631-x>
- Deng, X. X., y N. W. Ho. 1990. «Xylulokinase activity in various yeasts including *Saccharomyces cerevisiae* containing the cloned xylulokinase gene. Scientific Note». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24-25: 193-99
- Devadas, Suganthi Martena, Mamatha Ballal, Peralam Yegneswaran Prakash, Manjunath H. Hande, Geetha V. Bhat, y Vinitha Mohandas. 2017. «Auxanographic carbohydrate

assimilation method for large scale yeast identification». *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR* 11 (4): DC01-3. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/25967.9653>

Diderich, J. A., J. A., J. M. Schuurmans, M. C. van Gaalen, A. L. Kruckerberg, y K. van Dam. 2001. «Functional analysis of the hexose transporter homologue *HXT5* in *Saccharomyces cerevisiae*». *Yeast (Chichester, England)* 18 (16): 1515-24. <https://doi.org/10.1002/yea.779>

Diderich, J. A., M. Schepper, P. van Hoek, M. A. Luttk, J. P. van Dijken, J. T. Pronk, P. Klaassen, *et al.*, 1999. «Glucose uptake kinetics and transcription of *HXT* genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (22): 15350-59. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.22.15350>

Does, A. L., y L. F. Bisson. 1989. «Characterization of xylose uptake in the yeasts *Pichia heedii* and *Pichia stipitis*». *Applied and Environmental Microbiology* 55 (1): 159-64. <https://doi.org/10.1128/AEM.55.1.159-164.1989>

Elbing, Karin, Christer Larsson, Roslyn M. Bill, Eva Albers, Jacky L. Snoep, Eckhard Boles, Stefan Hohmann, y Lena Gustafsson. 2004. «Role of Hexose Transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*». *Applied and Environmental Microbiology* 70 (9): 5323-30. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5323-5330.2004>

Eliasson, A., E. Boles, B. Johansson, M. Osterberg, J. M. Thevelein, I. Spencer-Martins, H. Juhnke, y B. Hahn-Hägerdal. 2000. «Xylulose fermentation by mutant and wild-type strains of *Zygosaccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*». *Applied Microbiology and Biotechnology* 53 (4): 376-82

Endalur Gopinarayanan, Venkatesh, y Nikhil U. Nair. 2018. «A semi-synthetic regulon enables rapid growth of yeast on xylose». *Nature Communications* 9 (1): 1233. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03645-7>

Endalur Gopinarayanan, Venkatesh, y Nikhil U. Nair. 2019. «Pentose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: The need to engineer global regulatory systems». *Biotechnology Journal* 14 (1): e1800364. <https://doi.org/10.1002/biot.201800364>

Espinoza-Acosta, José Luis. 2020. «Biotechnological production of xylitol from agricultural waste». *Biotecnia* 22 (1): 126-34. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i1.1160>

Farwick, A., S. Bruder, V. Schadeweg, M. Oreb, y E. Boles. 2014. «Engineering of yeast Hexose Transporters to transport D-Xylose without Inhibition by D-Glucose». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (14): 5159-64. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323464111>

Fernández, R., P. Herrero, S. Gascón, y F. Moreno. 1984. «Xylose induced decrease in Hexokinase PII activity confers resistance to carbon catabolite repression of invertase

synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*». *Archives of Microbiology* 139 (2): 139-42. <https://doi.org/10.1007/BF00401988>

Fukuda, Akira, Yuki Kuriya, Jin Konishi, Kozue Mutaguchi, Takeshi Uemura, Daisuke Miura, y Masahiro Okamoto. 2018. «Kinetic modeling and sensitivity analysis for higher ethanol production in self-cloning xylose-using *Saccharomyces cerevisiae*». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 127 (5): 563-69. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.10.020>

Garcia Sanchez, Rosa, Kaisa Karhumaa, César Fonseca, Violeta Sánchez Nogué, João RM Almeida, Christer U. Larsson, Oskar Bengtsson, Maurizio Bettiga, Bärbel Hahn-Hägerdal, y Marie F. Gorwa-Grauslund. 2010. «Improved xylose and arabinose utilization by an industrial recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain using evolutionary engineering». *Biotechnology for Biofuels* 3 (1): 13. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-13>

Gietz, R. D., A. ST Jean, R. A. Woods, y R. H. Schiestl. 1992. «Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells.» *Nucleic Acids Research* 20 (6): 1425

Gietz, R. D., y R. A. Woods. 2002. «Transformation of yeast by Lithium Acetate/single-stranded carrier DNA/Polyethylene Glycol method». *Methods in Enzymology* 350: 87-96

Gietz, R. Daniel, y Robert H. Schiestl. 2007. «High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method». *Nature Protocols* 2 (1): 31-34. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.13>

Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, et al., 1996. «Life with 6000 Genes». *Science (New York, N.Y.)* 274 (5287): 546, 563-67

Gonçalves, D. L. 2014. «Influência dos transportadores de açúcares na fermentação de xilose por linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*». Tese (Doutorado em Bioquímica), Florianópolis - SC: Universidade Federal de Santa Catarina

Gonçalves, D. L., A. Matsushika, B. B. de Sales, T. Goshima, E. P. S. Bon, y B. U. Stambuk. 2014. «Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual Hexose Transporters». *Enzyme and Microbial Technology* 63: 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.05.003>

Gong, C. S., T. A. Claypool, L. D. McCracken, C. M. Maun, P. P. Ueng, y G. T. Tsao. 1983. «Conversion of pentoses by yeasts». *Biotechnology and Bioengineering* 25 (1): 85-102. <https://doi.org/10.1002/bit.260250108>

Gong, Cheng-Shung, Li-Fu Chen, Michael C. Flickinger, Lin-Chang Chiang, y George T. Tsao. 1981. «Production of ethanol from D-Xylose by using D-xylose isomerase and yeasts». *Applied and Environmental Microbiology* 41 (2): 430-36

Granström, Tom Birger, Goro Takata, Masaaki Tokuda, y Ken Izumori. 2004. «Izumoring: A novel and complete strategy for bioproduction of rare sugars». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 97 (2): 89-94. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70173-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70173-5)

- Grunstein, Michael, y Susan M. Gasser. 2013. «Epigenetics in *Saccharomyces cerevisiae*». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (7).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017491>
- Gueldener, U., J. Heinisch, G. J. Koehler, D. Voss, y J. H. Hegemann. 2002. «A second set of *LoxP* marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast». *Nucleic Acids Research* 30 (6): e23
- Güldener, Ulrich, Susanne Heck, Thomas Fiedler, Jens Beinhauer, y Johannes H. Hegemann. 1996. «A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast». *Nucleic Acids Research* 24 (13): 2519-24. <https://doi.org/10.1093/nar/24.13.2519>
- Hahn-hägerdal, B., T. Lindén, T. Senac, y K. Skoog. 1991. «Ethanol fermentation of pentoses in lignocellulose hydrolysates». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 28-29 (1): 131-44. <https://doi.org/10.1007/BF02922595>
- Hahn-Hägerdal, Bärbel, Sissi Berner, y Kerstin Skoog. 1986. «Improved ethanol production from xylose with glucose isomerase and *Saccharomyces cerevisiae* Using the respiratory inhibitor azide». *Applied Microbiology and Biotechnology* 24 (4): 287-93. <https://doi.org/10.1007/BF00257051>
- Hamacher, Tanja, Jessica Becker, Márk Gárdonyi, Bärbel Hahn-Hägerdal, y Eckhard Boles. 2002. «Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization». *Microbiology (Reading, England)* 148 (Pt 9): 2783-88. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-9-2783>
- Hammond, John R. M. 2003. «Yeast Genetics». En *Brewing Microbiology*, editado por Fergus G. Priest y Iain Campbell, 67-112. Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9250-5_3
- Han, Ji-Hye, Ju-Yong Park, Hyun Woo Kang, Gi-Wook Choi, Bong-Woo Chung, y Jiho Min. 2010. «Specific Expression Patterns of Xyl1, Xyl2 and Xyl3 in Response to different sugars in *Pichia stipitis*». *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20 (5): 946-49. <https://doi.org/10.4014/jmb.0912.12028>
- Hanly, T. J., y M. A. Henson. 2013. «Dynamic metabolic modeling of a microaerobic yeast co-culture: predicting and optimizing ethanol production from glucose/xylose mixtures.», 2013, sec. 6:44
- Harju, S., H. Fedosyuk, y K. R. Peterson. 2004. «Rapid Isolation of Yeast Genomic DNA: Bust n' Grab». *BMC Biotechnology* 4 (abril): 8. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-8>
- Hector, R. E., J. A. Mertens, M. J. Bowman, N. N. Nichols, M. A. Cotta, y S. R. Hughes. 2011. «*Saccharomyces cerevisiae* Engineered for Xylose Metabolism Requires Gluconeogenesis and the Oxidative Branch of the Pentose Phosphate Pathway for

- Aerobic Xylose Assimilation». *Yeast (Chichester, England)* 28 (9): 645-60.
<https://doi.org/10.1002/yea.1893>
- Heredia, C. F., A. Sols, y G. Dela Fuente. 1968. «Specificity of the constitutive hexose transport in yeast». *European Journal of Biochemistry* 5 (3): 321-29.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1968.tb00373.x>
- Ho, Nancy W. Y., y Sue-Fen Chang. 1989. «Cloning of yeast xylulokinase gene by complementation of *E. coli* and yeast mutations». *Enzyme and Microbial Technology* 11 (7): 417-21. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(89\)90136-1](https://doi.org/10.1016/0141-0229(89)90136-1)
- Hofer, M., y F. R. Nassar. 1987. «Aerobic and anaerobic uptake of sugars in *Schizosaccharomyces pombe*». *Microbiology* 133 (8): 2163-72.
<https://doi.org/10.1099/00221287-133-8-2163>
- Hohenschuh, William, Ronald Hector, y Ganti S. Murthy. 2015. «A dynamic flux balance model and bottleneck identification of glucose, xylose, xylulose co-fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*». *Bioresource Technology* 188: 153-60.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.015>
- Hou, Jin, Chenxi Qiu, Yu Shen, Hongxing Li, y Xiaoming Bao. 2017. «Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the efficient co-utilization of glucose and xylose». *FEMS Yeast Research* 17 (4). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox034>
- Hou, X. 2012. «anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*». *Applied Microbiology and Biotechnology* 94 (1): 205-14. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3694-4>
- Hovsepian, Junie, Quentin Defenouillère, Véronique Albanèse, Libuše Váchová, Camille Garcia, Zdena Palková, y Sébastien Léon. 2017. «multilevel regulation of an α -arrestin by glucose depletion controls Hexose Transporter endocytosis». *The Journal of Cell Biology* 216 (6): 1811-31. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610094>
- Howard, R. L., E. Abotsi, EL Jansen van Rensburg, y S. Howard. 2003. «Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production». *African Journal of Biotechnology* 2 (12): 602-19. <https://doi.org/10.4314/ajb.v2i12.14892>
- Hsiao, H Y, L C Chiang, P P Ueng, y G T Tsao. 1982. «Sequential utilization of mixed monosaccharides by yeasts». *Applied and Environmental Microbiology* 43 (4): 840-45
- Huxley, C., E. D. Green, y I. Dunham. 1990. «Rapid Assessment of *S. cerevisiae* Mating Type by PCR». *Trends in Genetics: TIG* 6 (8): 236
- Ito, Keisuke, Sohei Ito, Tatsuro Shimamura, Yasuaki Kawarasaki, Keiko Abe, Takumi Misaka, Takuya Kobayashi, y So Iwata. 2010. «Crystallization and preliminary X-ray analysis of a glucansucrase from the dental caries pathogen *Streptococcus mutans*». *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* 66 (Pt 9): 1086-88. <https://doi.org/10.1107/S1744309110029714>

Jeffries, T. W., y N. Q. SHI. 1999. «Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts». *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 65: 117-61

Jeffries, Thomas W., Igor V. Grigoriev, Jane Grimwood, José M. Laplaza, Andrea Aerts, Asaf Salamov, Jeremy Schmutz, et al. 2007. «Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia Stipitis*». *Nature Biotechnology* 25 (3): 319-26. <https://doi.org/10.1038/nbt1290>

Jeppsson, H, S Yu, y B Hahn-Hägerdal. 1996. «Xylulose and glucose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in chemostat culture.» *Applied and Environmental Microbiology* 62 (5): 1705-9

Johansson, Björn, y Bärbel Hahn-Hägerdal. 2002. «the non-oxidative pentose phosphate pathway controls the fermentation rate of xylulose but not of xylose in *Saccharomyces cerevisiae* TMB3001». *FEMS Yeast Research* 2 (3): 277-82. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00114-9)

Jönsson, Leif J, Björn Alriksson, y Nils-Olof Nilvebrant. 2013. «Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification». *Biotechnology for Biofuels* 6 (enero): 16. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>

Jordan, Paulina, Jun-Yong Choe, Eckhard Boles, y Mislav Oreb. 2016. «Hxt13, Hxt15, Hxt16 and Hxt17 from *Saccharomyces cerevisiae* represent a novel type of polyol transporters». *Scientific Reports* 6 (1): 23502. <https://doi.org/10.1038/srep23502>

Kahar, Prihardi, Kazuo Taku, y Shuzo Tanaka. 2011. «Enhancement of Xylose Uptake in 2-Deoxyglucose tolerant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111 (5): 557-63. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.12.020>

Kilian, S. G., B. A. Prior, y J. C. du Preez. 1993. «The kinetics and regulation of M-xylose transport in *Candida Utilis*». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9 (3): 357-60. <https://doi.org/10.1007/BF00383080>

Kim, S. R., H. Xu, A. Lesmana, U. Kuzmanovic, M. AU, C. Florencia, E. J. Oh, G. Zhang, K. H. Kim, y Y-S. Jin. 2015. «Deletion of *PHO13*, encoding haloacid dehalogenase type iia phosphatase, results in upregulation of the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*». *Applied and Environmental Microbiology* 81 (5): 1601-9. <https://doi.org/10.1128/AEM.03474-14>

Kim, Soo Rin, Jeffrey M. Skerker, Wei Kang, Anastashia Lesmana, Na Wei, Adam P. Arkin, y Yong-Su Jin. 2013. «Rational and evolutionary engineering approaches uncover a small set of genetic changes efficient for rapid xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*». *PLOS ONE* 8 (2): e57048. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057048>

- Kobayashi, Yosuke, Takehiko Sahara, Satoru Ohgiya, Yoichi Kamagata, y Kazuhiro E. Fujimori. 2018. «Systematic optimization of gene expression of pentose phosphate pathway enhances ethanol production from a glucose/xylose mixed medium in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*». *AMB Express* 8 (1): 139. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0670-8>
- Konishi, Jin, Akira Fukuda, Kozue Mutaguchi, y Takeshi Uemura. 2015. «Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using endogenous xylose-assimilating genes». *Biotechnology Letters* 37 (8): 1623-30. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1840-2>
- Korabecna, M. 2007. «The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its biological meaning and application». En *in Medical Mycology. In Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, Méndez-Vilas*
- Kötter, P., y M. Ciriacy. 1993. «Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*». *Applied Microbiology and Biotechnology* 38 (6): 776-83. <https://doi.org/10.1007/BF00167144>
- Kotyk, A. 1967. «Properties of the sugar carrier in baker's yeast. II. Specificity of Transport». *Folia Microbiologica* 12 (2): 121-31. <https://doi.org/10.1007/BF02896872>
- Kotyk, A., y A. Kleinzeller. 1963. «Transport of D-Xylose and sugar space in baker's yeast». *Folia Microbiologica* 8 (mayo): 156-64. <https://doi.org/10.1007/BF02894974>
- Kruckeberg, A. L. 1996. «The Hexose Transporter Family of *Saccharomyces cerevisiae*». *Archives of Microbiology* 166 (5): 283-92. <https://doi.org/10.1007/s002030050385>
- Kurtzman, Cletus, J. W. Fell, y Teun Boekhout. 2011. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 5.^a ed. Elsevier
- Kuyper, M., M. J. Toirkens, J. A. Diderich, A. A. Winkler, J. P. van Dijken, y J. T. Pronk. 2005. «Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain». *FEMS Yeast Research* 5 (10): 925-34. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2005.04.004>
- Kwolek-Mirek, Magdalena, y Renata Zadrag-Tecza. 2014. «Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells». *FEMS Yeast Research* 14 (7): 1068-79. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12202>
- Lagunas, R., C. Dominguez, A. Busturia, y M. J. Sáez. 1982. «Mechanisms of appearance of the pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems». *Journal of Bacteriology* 152 (1): 19-25
- Lancheros-Castaneda, S., D. Morales Fonseca, y M. Velásquez Lozano. 2015. «Increase in second generation ethanol production by different nutritional conditions from sugarcane

bagasse hydrolysate using a *Saccharomyces cerevisiae* Native Strain». *Chemical Engineering Transactions* 43 (mayo): 223-28. <https://doi.org/10.3303/CET1543038>

Larochelle, M., S. Drouin, F. Robert, y B. Turcotte. 2006. «Oxidative stress-activated Zinc Cluster protein Stb5 has dual Activator/Repressor functions required for pentose phosphate pathway regulation and NADPH production». *Molecular and Cellular Biology* 26 (17): 6690-6701. <https://doi.org/10.1128/MCB.02450-05>

Leão, Cecília, y N. van Uden. 1985. «Effects of ethanol and other alkanols on the temperature relations of glucose transport and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*». *Applied Microbiology and Biotechnology* 22 (5): 359-63. <https://doi.org/10.1007/BF00582420>

Lee, Hung. 1998. «Review: The structure and function of yeast xylose (aldose) reductases». *Yeast* 14 (11): 977-84. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199808\)14:11<977::AID-YEA302>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199808)14:11<977::AID-YEA302>3.0.CO;2-J)

Lee, T.-H., M.-D. Kim, Y.-C. Park, S.-M. Bae, Y.-W. Ryu, y J.-H. Seo. 2003. «effects of xylulokinase activity on ethanol production from d-xylulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*». *Journal of Applied Microbiology* 95 (4): 847-52

Lee, W.-J., M.-D. Kim, Y.-W. Ryu, L. F. Bisson, y J.-H. Seo. 2002. «Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*». *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (1-2): 186-91. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1085-6>

Li, Hongxing, Yu Shen, Meiling Wu, Jin Hou, Chunlei Jiao, Zailu Li, Xinli Liu, y Xiaoming Bao. 2016. «Engineering a wild-type diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain for second-generation bioethanol production». *Bioresources and Bioprocessing* 3 (1). <https://doi.org/10.1186/s40643-016-0126-4>

Li, Hongxing, Meiling Wu, Lili Xu, Jin Hou, Ting Guo, Xiaoming Bao, y Yu Shen. 2015. «Evaluation of Industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains as the chassis cell for second-generation bioethanol production». *Microbial Biotechnology* 8 (2): 266-74. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12245>

Lin, Yan, y Shuzo Tanaka. 2006. «Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects». *Applied Microbiology and Biotechnology* 69 (6): 627-42. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0229-x>

Lin, Zhenguo, y Wen-Hsiung Li. 2011. «Expansion of Hexose Transporter genes was associated with the evolution of aerobic fermentation in yeasts». *Molecular Biology and Evolution* 28 (1): 131-42. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq184>

- Lindén, Torbjörn, y Bärbel Hahn-Hägerdal. 1989. «Fermentation of lignocellulose hydrolysates with yeasts and xylose isomerase». *Enzyme and Microbial Technology* 11 (9): 583-89. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(89\)90086-0](https://doi.org/10.1016/0141-0229(89)90086-0)
- Lohr, D. 1997. «Nucleosome transactions on the promoters of the yeast *GAL* and *PHO* genes». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (43): 26795-98
- Löoke, M., K. Kristjuhan, y A. Kristjuhan. 2011. «Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-Based applications». *BioTechniques* 50 (5): 325-28. <https://doi.org/10.2144/000113672>
- Ma, Jun, y Mark Ptashne. 1987. «The carboxy-terminal 30 amino acids of *GAL4* are recognized by *GAL80*». *Cell* 50 (1): 137-42. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90670-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90670-2)
- Maier, Andreas, Bernhard Völker, Eckhard Boles, y Günter Fred Fuhrmann. 2002. «Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 Transporters». *FEMS Yeast Research* 2 (4): 539-50. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00121.x>
- Malakar, Pushkar, y Kareenhalli V. Venkatesh. 2014. «*GAL* regulon of *Saccharomyces cerevisiae* performs optimally to maximize growth on galactose». *FEMS Yeast Research* 14 (2): 346-56. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12109>
- Maleszka, R., y H. Schneider. 1984. «Involvement of oxygen and mitochondrial function in the metabolism of D-Xylulose by *Saccharomyces cerevisiae*». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 228 (1): 22-30
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, y J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Maqueda, Matilde, Emiliano Zamora, Nieves Rodríguez-Cousiño, y Manuel Ramírez. 2010. «Wine yeast molecular typing using a simplified method for simultaneously extracting mtDNA, nuclear DNA and virus DsRNA». *Food Microbiology* 27 (2): 205-9. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.10.004>
- Marsit, Souhir, Adriana Mena, Frédéric Bigey, François-Xavier Sauvage, Arnaud Couloux, Julie Guy, Jean-Luc Legras, Eladio Barrio, Sylvie Dequin, y Virginie Galeote. 2015. «evolutionary advantage conferred by an eukaryote-to-eukaryote gene transfer event in wine yeasts». *Molecular Biology and Evolution* 32 (7): 1695-1707. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv057>
- Matsushika, A., T. Goshima, y T. Hoshino. 2014. «Transcription analysis of recombinant industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains reveals the molecular basis for fermentation of glucose and xylose». *Microbial Cell Factories* 13: 16. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-16>

- Matsushika, A., H. Inoue, T. Kodaki, y S. Sawayama. 2009. «Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* Strains: current state and perspectives». *Applied Microbiology and Biotechnology* 84 (1): 37-53. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2101-x>
- Matsushika, A., S. Watanabe, T. Kodaki, K. Makino, H. Inoue, K. Murakami, O. Takimura, y S. Sawayama. 2008. «Expression of protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*». *Applied Microbiology and Biotechnology* 81 (2): 243-55. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1649-1>
- Matsushika, A., S. Watanabe, T. Kodaki, K. Makino, y S. Sawayama. 2008. «Bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing xylose reductase, NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase, and xylulokinase». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 105 (3): 296-99. <https://doi.org/10.1263/jbb.105.296>
- McClellan, C. J., y L. F. Bisson. 1988. «Glucose Uptake in *Saccharomyces cerevisiae* Grown under Anaerobic Conditions: effect of null mutations in the hexokinase and glucokinase structural genes». *Journal of Bacteriology* 170 (11): 5396-5400. <https://doi.org/10.1128/jb.170.11.5396-5400.1988>
- McIlwain, Sean J., David Peris, Maria Sardi, Oleg V. Moskvina, Fujie Zhan, Kevin S. Myers, Nicholas M. Riley, et al. 2016. «Genome sequence and analysis of a stress-tolerant, wild-derived strain of *Saccharomyces cerevisiae* used in biofuels research». *G3: Genes/Genomes/Genetics* 6 (6): 1757-66. <https://doi.org/10.1534/g3.116.029389>
- Michael, Drew G., Ezekiel J. Maier, Holly Brown, Stacey R. Gish, Christopher Fiore, Randall H. Brown, y Michael R. Brent. 2016. «Model-based transcriptome engineering promotes a fermentative transcriptional state in yeast». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (47): E7428-37. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603577113>
- Milessi, Thais Suzane, Patricia M. Aquino, Cláudia R. Silva, Guilherme S. Moraes, Teresa C. Zangirolami, Roberto C. Giordano, y Raquel L. C. Giordano. 2018. «Influence of key variables on the simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose by a native *Saccharomyces cerevisiae* strain co-encapsulated with xylose isomerase for 2G ethanol production». *Biomass and Bioenergy* 119 (diciembre): 277-83. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.09.016>
- Mittelman, Karin, y Naama Barkai. 2017. «the genetic requirements for pentose fermentation in budding yeast». *G3 (Bethesda, Md.)* 7 (6): 1743-52. <https://doi.org/10.1534/g3.117.039610>
- Monošík, R., P. Magdolen, M. Stredanský, y E. Šturdík. 2013. «Monitoring of monosaccharides, oligosaccharides, ethanol and glycerol during wort fermentation by

- biosensors, HPLC and spectrophotometry». *Food Chemistry* 138 (1): 220-26. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.039>
- Moreno, Fernando, Montserrat Vega, y Pilar Herrero. 2016. «The nuclear Hexokinase 2 acts as a glucose sensor in *Saccharomyces cerevisiae*». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (32): 16478. <https://doi.org/10.1074/jbc.L116.738237>
- Mortimer, R. K., y J. R. Johnston. 1986. «Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center». *Genetics* 113 (1): 35-43
- Moysés, Danuza Nogueira, Viviane Castelo Branco Reis, João Ricardo Moreira de Almeida, Lidia Maria Pepe de Moraes, y Fernando Araripe Gonçalves Torres. 2016. «Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: challenges and prospects». *International Journal of Molecular Sciences* 17 (3). <https://doi.org/10.3390/ijms17030207>
- Muir, Alastair, Elizabeth Harrison, y Alan Wheals. 2011. «A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus *Saccharomyces*». *FEMS Yeast Research* 11 (7): 552-63. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00745.x>
- Nakano, Kazunori, Ryosuke Katsu, Kiyoshi Tada, y Masatoshi Matsumura. 2000. «production of highly concentrated xylitol by *Candida magnoliae* under a microaerobic condition maintained by simple fuzzy control». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89 (4): 372-76. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)88961-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)88961-6)
- Nasir, Armanul, Shafkat Shamim Rahman, Md Mahboob Hossain, y Naiyyum Choudhury. 2017. «Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* from pineapple and orange and study of metal's effectiveness on ethanol production». *European Journal of Microbiology & Immunology* 7 (1): 76-91. <https://doi.org/10.1556/1886.2016.00035>
- NEB. 2017. «PCR Using Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (M0491) | NEB». 2017. <https://www.neb.com/protocols/2013/12/13/pcr-using-q5-high-fidelity-dna-polymerase-m0491>
- Ni, H., J. M. Laplaza, y T. W. Jeffries. 2007. «Transposon mutagenesis to improve the growth of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on d-Xylose». *Applied and Environmental Microbiology* 73 (7): 2061-66. <https://doi.org/10.1128/AEM.02564-06>
- Nijland, Jeroen G., Hyun Yong Shin, Leonie G. M. Boender, Paul P. de Waal, Paul Klaassen, y Arnold J. M. Driessen. 2017. «Improved xylose metabolism by a CYC8 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*». *Appl. Environ. Microbiol.* 83 (11): e00095-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00095-17>
- Nijland, Jeroen G., Erwin Vos, Hyun Yong Shin, Paul P. de Waal, Paul Klaassen, y Arnold J. M. Driessen. 2016. «Improving pentose fermentation by preventing ubiquitination of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*». *Biotechnology for Biofuels* 9: 158. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0573-3>

Novo, Maite, Frédéric Bigey, Emmanuelle Beyne, Virginie Galeote, Frédérick Gavory, Sandrine Mallet, Brigitte Cambon, et al. 2009. «Eukaryote-to-Eukaryote Gene Transfer Events Revealed by the Genome Sequence of the Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (38): 16333-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904673106>

Novy, Vera, Bernd Brunner, Gerdt Müller, y Bernd Nidetzky. 2017. «Toward “homolactic” fermentation of glucose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring a kinetically efficient L-Lactate dehydrogenase within *Pdc1* - *Pdc5* deletion background: L-lactic acid production from glucose and xylose». *Biotechnology and Bioengineering* 114 (1): 163-71. <https://doi.org/10.1002/bit.26048>

Osiro, Karen O., Daniel P. Brink, Celina Borgström, Lisa Wasserstrom, Magnus Carlquist, y Marie F. Gorwa-Grauslund. 2018. «Assessing the effect of D-Xylose on the sugar signaling pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in strains engineered for xylose transport and assimilation». *FEMS Yeast Research* 18 (1). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox096>

Özcan, Sabire, y Mark Johnston. 1999. «Function and regulation of yeast Hexose Transporters». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (3): 554-69

Panchal, Chandra J., Lynda Bast, Inge Russell, y Graham G. Stewart. 1988. «Repression of xylose utilization by glucose in xylose-fermenting yeasts». *Canadian Journal of Microbiology* 34: 1316-20. <https://doi.org/10.1139/m88-230>

Parachin, Nádia S., Oskar Bengtsson, Bärbel Hahn-Hägerdal, y Marie-F. Gorwa-Grauslund. 2010. «The Deletion of YLR042c Improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*». *Yeast* 27 (9): 741-51. <https://doi.org/10.1002/yea.1777>

Patiño, M. A. 2015. «Engenharia evolutiva e genômica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes fermentadoras de xilose». Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências), Florianópolis - SC: Universidade Federal de Santa Catarina

Patiño, M. A., J. P. Ortiz, M. Velásquez, y B. U. Stambuk. 2019. «D-Xylose consumption by nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae*: A Review». *Yeast (Chichester, England)*, junio. <https://doi.org/10.1002/yea.3429>

Peng, Gang, y James E. Hopper. 2002. «Gene activation by interaction of an inhibitor with a cytoplasmic signaling protein». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (13): 8548-53. <https://doi.org/10.1073/pnas.142100099>

Petit, T., J. A. Diderich, A. L. Kruckeberg, C. Gancedo, y K. Van Dam. 2000. «Hexokinase regulates kinetics of glucose transport and expression of genes encoding hexose

- transporters in *Saccharomyces cerevisiae*». *Journal of Bacteriology* 182 (23): 6815-18. <https://doi.org/10.1128/jb.182.23.6815-6818.2000>
- Petracek, M. E., y M. S. Longtine. 2002. «PCR-based engineering of yeast genome». *Methods in Enzymology* 350: 445-69
- Postma, E., W. A. Scheffers, y J. P. van Dijken. 1989. «Kinetics of growth and glucose transport in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces Cerevisiae* CBS 8066». *Yeast (Chichester, England)* 5 (3): 159-65. <https://doi.org/10.1002/yea.320050305>
- Preez, J. C. du, S. H. de Kock, S. G. Kilian, y D. Litthauer. 2000. «The relationship between transport kinetics and glucose uptake by *Saccharomyces cerevisiae* in aerobic chemostat cultures». *Antonie Van Leeuwenhoek* 77 (4): 379-88. <https://doi.org/10.1023/a:1002744100953>
- Ramos, J, K Szkutnicka, y V P Cirillo. 1988. «Relationship between low- and high-affinity glucose transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*». *Journal of Bacteriology* 170 (11): 5375-77
- Rao, Kripa, Silpa Chelikani, Patricia Relue, y Sasidhar Varanasi. 2008. «A Novel technique that enables efficient conduct of simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 146 (1-3): 101-17. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8122-y>
- Reifenberger, E., E. Boles, y M. Ciriacy. 1997. «Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression». *European Journal of Biochemistry* 245 (2): 324-33
- Reifenberger, E., K. Freidel, y M. Ciriacy. 1995. «Identification of Novel *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual Hexose Transporters on Glycolytic Flux». *Molecular Microbiology* 16 (1): 157-67
- Reis, V. C. B. 2012. «Modificações genéticas em linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação de xilose». Tese (Doutorado em Biologia Molecular), Universidade de Brasília. <http://repositorio.unb.br/handle/10482/13119>
- Ren, B., F. Robert, J. J. Wyrick, O. Aparicio, E. G. Jennings, I. Simon, J. Zeitlinger, et al. 2000. «Genome-wide location and function of DNA binding proteins». *Science (New York, N. Y.)* 290 (5500): 2306-9. <https://doi.org/10.1126/science.290.5500.2306>
- Richard, P., M. H. Toivari, y M. Penttilä. 1999. «Evidence that the gene YLR070c of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase». *FEBS Letters* 457 (1): 135-38
- Richard, P., M. H. Toivari, y M. Penttilä. 2000. «The role of xylulokinase in *Saccharomyces cerevisiae* xylulose catabolism». *FEMS Microbiology Letters* 190 (1): 39-43. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09259.x>

- Rodríguez-Peña, J. M., V. J. Cid, J. Arroyo, y C. Nombela. 1998. «The YGR194c (XKS1) gene encodes the xylulokinase from the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*». *FEMS Microbiology Letters* 162 (1): 155-60
- Roy, Adhiraj, Yong-Bae Kim, Kyu Hong Cho, y Jeong-Ho Kim. 2014. «Glucose starvation-induced turnover of the yeast glucose transporter Hxt1». *Biochimica et biophysica acta* 1840 (9): 2878-85. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.05.004>
- Sabatinos, Sarah A., y Susan L. Forsburg. 2009. «Measuring DNA content by flow cytometry in fission yeast». En *DNA Replication*, editado por Sonya Vengrova y Jacob Z. Dalgaard, 449-61. *Methods in Molecular Biology* 521. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-815-7_25
- Sá-Correia, I., y N. van Uden. 1983. «Effect of ethanol on the fructose transport system of *Kluyveromyces fragilis*». *Biotechnology Letters* 5 (6): 413-18. <https://doi.org/10.1007/BF00131283>
- Sales, B. de, B. Scheid, D. Gonçalves, M. Knychala, A. Matsushika, E. Bon, y Boris U. Stambuk. 2015. «Cloning novel sugar transporters from *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* allowing D-xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*». *Biotechnology Letters* 37 (10): 1973-82. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1893-2>
- Saloheimo, A., J. Rauta, O. V. Stasyk, A. A. Sibirny, M. Penttilä, y L. Ruohonen. 2007. «Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases». *Applied Microbiology and Biotechnology* 74 (5): 1041-52. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0747-1>
- Sambrook, J., y D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. CSHL Press
- Sánchez, Sebastián, Vicente Bravo, Eulogio Castro, Alberto J. Moya, y Fernando Camacho. 2002. «The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to Produce Ethanol». *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 77 (6): 641-48. <https://doi.org/10.1002/jctb.622>
- Sato, Trey K., Mary Tremaine, Lucas S. Parreiras, Alexander S. Hebert, Kevin S. Myers, Alan J. Higbee, Maria Sardi, et al. 2016. «Directed evolution reveals unexpected epistatic interactions that alter metabolic regulation and enable anaerobic xylose use by *Saccharomyces cerevisiae*». *PLoS Genetics* 12 (10): e1006372. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006372>
- Scalcinati, Gionata, José Manuel Otero, Jennifer R. H. Van Vleet, Thomas W. Jeffries, Lisbeth Olsson, y Jens Nielsen. 2012. «Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient aerobic xylose consumption». *FEMS Yeast Research* 12 (5): 582-97. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00808.x>

- Schiestl, R. H., y R. D. Gietz. 1989. «High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier». *Current Genetics* 16 (5-6): 339-46. <https://doi.org/10.1007/BF00340712>
- Schuddemat, J., P. J. Van den Broek, y J. Van Steveninck. 1986. «Effect of xylose incubation on the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*». *Biochimica Et Biophysica Acta* 861 (3): 489-93. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(86\)90459-1](https://doi.org/10.1016/0005-2736(86)90459-1)
- Sedlak, M., y N. W. Y. Ho. 2004. «Production of ethanol from cellulosic biomass hydrolysates using genetically engineered *Saccharomyces* Yeast Capable of cofermenting glucose and xylose». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 113-116: 403-16. [10.1385/abab:114:1-3:403](https://doi.org/10.1385/abab:114:1-3:403)
- Serrano, R., y G. Delafuente. 1974. «Regulatory properties of the constitutive hexose transport in *Saccharomyces cerevisiae*». *Molecular and Cellular Biochemistry* 5 (3): 161-71. <https://doi.org/10.1007/BF01731379>
- SGD. 2017. «Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast». 2017. <http://www.yeastgenome.org/>
- SGD. 2018. «Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast». 2018. <https://www.yeastgenome.org/locus/S000003920>
- Sharma, Shalley, Eldho Varghese, Anju Arora, K. N. Singh, Surender Singh, Lata Nain, y Debarati Paul. 2018. «Augmenting pentose utilization and ethanol production of native *Saccharomyces cerevisiae* LN using medium engineering and response surface methodology». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 6: 132. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00132>
- Shen, Y., X. Chen, B. Peng, L. Chen, J. Hou, y X. Bao. 2012. «An efficient xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained through adaptive evolution and its global transcription profile». *Applied Microbiology and Biotechnology* 96 (4): 1079-91. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4418-0>
- Shoham, M., y T. A. Steitz. 1982. «The 6-Hydroxymethyl group of a hexose is essential for the substrate-induced closure of the cleft in hexokinase». *Biochimica Et Biophysica Acta* 705 (3): 380-84. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(82\)90260-6](https://doi.org/10.1016/0167-4838(82)90260-6)
- Smiley, Karl L., y Paul L. Bolen. 1982. «Demonstration of D-xylose reductase and D-xylitol dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus*». *Biotechnology Letters* 4 (9): 607-10. <https://doi.org/10.1007/BF00127793>
- Smith, J., E. van Rensbeurg, y J. F. Görgens. 2014. «Simultaneously improving xylose fermentation and tolerance to lignocellulosic inhibitors through evolutionary engineering of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring xylose isomerase». *BMC Biotechnology* 14: 41. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-41>

- Sonderegger, M., y U. Sauer. 2003. «Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose». *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4): 1990-98
- Stambuk, B. U., B. Dunn, S. L. Alves, E. H. Duval, y G. Sherlock. 2009. «Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis». *Genome Research* 19 (12): 2271-78.
<https://doi.org/10.1101/gr.094276.109>
- Stambuk, B. U., E. C. A. Eleutherio, L. M. Florez-pardo, A. M. Souto-maior, y E. P. S. Bon. 2008. «Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains», 2008, sec. 67
- Stambuk, Boris U., Mary Ann Franden, Arjun Singh, y Min Zhang. 2003. «D-Xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 105-108: 255-63. <https://doi.org/10.1385/abab:106:1-3:255>
- Subtil, T., y E. Boles. 2012. «Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*». *Biotechnology for Biofuels* 5: 14. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-14>
- Suihko, M.-L., y K. Poutanen. 1984. «D-xylulose fermentation by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells». *Biotechnology Letters* 6 (3): 189-94.
<https://doi.org/10.1007/BF00127037>
- Tamari, Zvi, Dalia Rosin, Yoav Voichek, y Naama Barkai. 2014. «Coordination of gene expression and growth-rate in natural populations of budding yeast». *PloS One* 9 (2): e88801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088801>
- Tamari, Zvi, Avihu H. Yona, Yitzhak Pilpel, y Naama Barkai. 2016. «Rapid evolutionary adaptation to growth on an “unfamiliar” carbon source». *BMC Genomics* 17: 674.
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-3010-x>
- Thompson, J. R., E. Register, J. Curotto, M. Kurtz, y R. Kelly. 1998. «An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation». *Yeast (Chichester, England)* 14 (6): 565-71. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980430\)14:6<565::AID-YEA251>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980430)14:6<565::AID-YEA251>3.0.CO;2-B)
- Timson, David J., Helen C. Ross, y Richard J. Reece. 2002. «Gal3p and Gal1p interact with the transcriptional repressor Gal80p to form a complex of 1:1 stoichiometry». *The Biochemical Journal* 363 (Pt 3): 515-20
- Toivari, Mervi H., Laura Salusjärvi, Laura Ruohonen, y Merja Penttilä. 2004. «Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*». *Applied and Environmental Microbiology* 70 (6): 3681-86. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3681-3686.2004>

- Träff K. L., Jönsson L. J., y Hahn-Hägerdal B. 2002. «Putative xylose and arabinose reductases in *Saccharomyces cerevisiae*». *Yeast* 19 (14): 1233-41.
<https://doi.org/10.1002/yea.913>
- Trumbly, R. J. 1992. «Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*». *Molecular Microbiology* 6 (1): 15-21
- Turner, Timothy L., Heejin Kim, In lok Kong, Jing-Jing Liu, Guo-Chang Zhang, y Yong-Su Jin. 2016. «Engineering and evolution of *Saccharomyces cerevisiae* to produce biofuels and chemicals». *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, diciembre.
https://doi.org/10.1007/10_2016_22
- Van Vleet, J. H., T. W. Jeffries, y L. Olsson. 2008. «Deleting the para-nitrophenyl phosphatase (PNPPase), PHO13, in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* improves growth and ethanol production on D-xylose». *Metabolic Engineering* 10 (6): 360-69.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2007.12.002>
- Van Zyl, C. V., B. A. Prior, S. G. Kilian, y J. L. F. Kock. 1989. «D-Xylose Utilization by *Saccharomyces cerevisiae*». *Journal of General Microbiology* 135 (11): 2791-98.
<https://doi.org/10.1099/00221287-135-11-2791>
- Velásquez, Mario, y Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos. 2015. «Informe técnico final Producción de etanol de segunda generación a partir de hidrolizado de bagazo de caña por levaduras y bacterias nativas»
- Verduyn, C., E. Postma, W. A. Scheffers, y J. P. Van Dijken. 1992. «Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation». *Yeast (Chichester, England)* 8 (7): 501-17.
<https://doi.org/10.1002/yea.320080703>
- Wahlbom, C. Fredrik, Ricardo R. Cordero Otero, Willem H. van Zyl, Bärbel Hahn-Hägerdal, y Leif J. Jönsson. 2003. «Molecular analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with improved ability to utilize xylose shows enhanced expression of proteins involved in transport, initial xylose metabolism, and the Pentose Phosphate Pathway». *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2): 740-46.
<https://doi.org/10.1128/aem.69.2.740-746.2003>
- Wang, P. Y., y H. Schneider. 1980. «Growth of Yeasts on D-Xylulose 1». *Canadian Journal of Microbiology* 26 (9): 1165-68
- Wang, Patrick Y., Charles Shopsis, y Henry Schneider. 1980. «Fermentation of a pentose by yeasts». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94 (1): 248-54.
[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(80\)80213-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(80)80213-0)
- Webb, S. R., y H. Lee. 1990. «Regulation of D-Xylose utilization by hexoses in pentose-fermenting yeasts». *Biotechnology Advances* 8 (4): 685-97

- Wei, N., H. Xu, S. R. Kim, y Y-S. Jin. 2013. «Deletion of FPS1, encoding aquaglyceroporin Fps1p, improves xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*». *Applied and Environmental Microbiology* 79 (10): 3193-3201. <https://doi.org/10.1128/AEM.00490-13>
- Wei, Shan, Yanan Liu, Meiling Wu, Tiantai Ma, Xiangzheng Bai, Jin Hou, Yu Shen, y Xiaoming Bao. 2018. «Disruption of the transcription factors Thi2p and Nrm1p alleviates the post-glucose effect on xylose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*». *Biotechnology for Biofuels* 11 (1): 112. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1112-1>
- Wenger, Jared W., Katja Schwartz, y Gavin Sherlock. 2010. «Bulk segregant analysis by high-throughput sequencing reveals a novel xylose utilization gene from *Saccharomyces cerevisiae*». *PLoS Genetics* 6 (5): e1000942. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000942>
- Westergaard, S. L., A. P. Oliveira, C. Bro, L. Olsson, y J. Nielsen. 2007. «A systems biology approach to study glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*». *Biotechnology and Bioengineering* 96 (1): 134-45. <https://doi.org/10.1002/bit.21135>
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, y J. Taylor. 1990. «38 - Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics». En *PCR Protocols*, editado por Michael A. Innis, David H. Gelfand, John J. Sninsky, y Thomas J. White, 315-22. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wieczorke, R., S. Krampe, T. Weierstall, K. Freidel, C. P. Hollenberg, y E. Boles. 1999. «Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*». *FEBS Letters* 464 (3): 123-28. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01698-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01698-1)
- Xu, Haiqing, Sooah Kim, Hagit Sorek, Youngsuk Lee, Deokyeol Jeong, Jungyeon Kim, Eun Joong Oh, et al. 2016. «PHO13 deletion-induced transcriptional activation prevents sedoheptulose accumulation during xylose metabolism in engineered *Saccharomyces cerevisiae*». *Metabolic Engineering* 34 (marzo): 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.12.007>
- Yablochkova, E. N., O. I. Bolotnikova, N. P. Mikhailova, N. N. Nemova, y A. I. Ginak. 2003. «The activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in yeasts». *Microbiology* 72 (4): 414-17. <https://doi.org/10.1023/A:1025032404238>
- Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, y T. L. Madden. 2012. «Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for Polymerase Chain Reaction». *BMC Bioinformatics* 13: 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Young, E., A. Poucher, A. Comer, A. Bailey, y H. Alper. 2011. «Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a Host».

Applied and Environmental Microbiology 77 (10): 3311-19.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02651-10>

Young, E., A. Tong, H. Bui, C. Spofford, y H. Alper. 2014. «Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (1): 131-36.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1311970111>

Yu, S., H. Jeppsson, y B. Hahn-Hägerdal. 1995. «Xylulose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and xylose-fermenting yeast strains». *Applied Microbiology and Biotechnology* 44 (3): 314-20. <https://doi.org/10.1007/BF00169922>

Yuan, Dawei, Kripa Rao, Patricia Relue, y Sasidhar Varanasi. 2011. «Fermentation of biomass sugars to ethanol using native industrial yeast strains». *Bioresource Technology* 102 (3): 3246-53. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.034>

Yuan, Dawei, Kripa Rao, Sasidhar Varanasi, y Patricia Relue. 2012. «A viable method and configuration for fermenting biomass sugars to ethanol using native *Saccharomyces cerevisiae*». *Bioresource Technology* 117 (agosto): 92-98.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.005>

Zeng, Wei-Yi, Yue-Qin Tang, Min Gou, Zhao-Yong Sun, Zi-Yuan Xia, y Kenji Kida. 2017. «Comparative transcriptomes reveal novel evolutionary strategies adopted by *Saccharomyces cerevisiae* with Improved xylose utilization capability». *Applied Microbiology and Biotechnology* 101 (4): 1753-67. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8046-y>

Zha, J., B-Z. Li, M-H. Shen, M-L. Hu, H. Song, y A. H. Yuan. 2013. «Optimization of CDT-1 and XYL1 expression for balanced co-production of ethanol and xylitol from cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*», 2013, sec. 8(7): e68317

Zha, Jian, Minghua Shen, Menglong Hu, Hao Song, y Yingjin Yuan. 2014. «Enhanced expression of genes involved in initial xylose metabolism and the oxidative pentose phosphate pathway in the improved xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* through evolutionary engineering». *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 41 (1): 27-39. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1350-y>

Zhang, F., S. Rodriguez, y J. D. Keasling. 2011. «Metabolic engineering of microbial pathways for advanced biofuels production». *Current Opinion in Biotechnology* 22 (6): 775-83. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.024>

Zhong, C., M. W. Lau, V. Balan, B. E. Dale, y Y-J. Yuan. 2009. «Optimization of enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation from AFEX-treated rice straw». *Applied Microbiology and Biotechnology* 84 (4): 667-76. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2001-0>

Zyl, C. van, B. A. Prior, S. G. Kilian, y E. V. Brandt. 1993. «Role of D-ribose as a cometabolite in D-Xylose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*». *Applied and Environmental Microbiology* 59 (5): 1487-94. <https://doi.org/10.1128/AEM.59.5.1487-1494.1993>