

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**“Generación de cepas recombinantes de *Pseudomonas*  
para la producción de etanol.”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado  
de Magíster en Bioquímica área de Especialización en  
Bioquímica ambiental y Memoria para optar al Título de  
Bioquímico por:**

***MYRIAM ANDREA NAVARRO PÉREZ***

**DIRECTORES DE TESIS**

**Dr. Gino Corsini Acuña**

**Santiago-Chile  
DICIEMBRE-2012**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**MYRIAM ANDREA NAVARRO PÉREZ**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: en Bioquímica Ambiental y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día \_\_\_\_\_

**Director de Tesis:**

**Dr. Gino Corsini Acuña** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dra. Lucia Inés Contreras Osorio** \_\_\_\_\_

**Dr. Jaime Romero Ormazabal** \_\_\_\_\_

**Dr. Carlos Santiviago Cid** \_\_\_\_\_

*"Nunca te das cuenta de lo que ya has hecho;  
Sólo puedes ver lo que te queda por hacer."*

*Marie Curie (1867-1934)  
Premio Nobel de Física 1903*

*A las personas que amo...*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre Myriam por su apoyo incondicional y por enseñarme todo lo que sé de la vida y José por ser un gran Padre y seguir cuidándome desde el cielo.

A mis hermanos Fernanda y Joshua por ser mis compañeros de aventura y soportar a su hermana mayor, siempre espero ser un gran ejemplo para ustedes y acompañarlos en cada etapa de su vida.

A Melannie por traer al mundo a mi sobrinito Vicente responsable de tantas alegrías.

A mis compañeros de Bachillerato, Jonathan Molina, Javier Nacif y Gabriel Ossa, por ser mis primeros grandes amigos en la Universidad, que me ayudaron a elegir este camino y que por razones de la vida seguimos senderos diferentes.

A Braulio Aranda, Patricio Cancino, Gonzalo Hasember por me darme la bienvenida a Ciencias Químicas, por ser mis compañeros de viaje, mis compañeros de estudio, mis confidentes y grandes amigos, por hacer mis dos primeros años de bioquímica los mejores años de carrera.

A Carla Miranda, Estefanía Muñoz, Ernesto Muñoz, Javiera Reyes, Daniela Fernandois, Nicolás Daneri, Jonathan Hechenleitner, Camilo Reyes, Daniela Soto, Fabián Jofré, Francisca Cristi, Tomy, Francisca Noya, Matias Rivera, GerardoVallejos, Luis Godoy, Carolina Vera, por ser más que compañeros de estudio y haber dejado su huella, por acogerme y apoyarme, por ser muchas veces compañeros de viaje, de carrete y soporte emocional.

A mi tutor de tesis Dr. Gino Corsini por confiar en mí, por la paciencia y por ser un gran guía no tan solo en lo científico sino también en lo emocional.

A mis compañeros de Laboratorio, Alonso Ferrer, Sebastián Lagos, Gonzalo Rojas, Guillermo Wiese, Paola Soto, Laura Gatta y especialmente a Luz María Carrera, Ruth Sepúlveda y

German Neumann por hacer una etapa inolvidable mi periodo de tesis, por soportarme, apoyarme y guiarme.

A mi amor Maximiliano Navarrete por apoyarme, contenerme y amarme, sin ti esto no hubiera sido posible. Te Amo.

Y todas aquellas personas que no han sido nombradas, pero que saben que han sido muy importantes para mí.

A todos ustedes muchas gracias...

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b>	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	x
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	xii
<b>ABREVIATURAS</b>	xiii
<b>RESUMEN</b>	xiv
<b>ABSTRACT</b>	xvi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Microorganismos silvestres productores de etanol	3
1.2 Organismos recombinantes para la producción de etanol	5
1.2.1 Modificación genética de <i>S. cerevisiae</i> y <i>Z. mobilis</i> para la metabolización de pentosas	7
1.2.2 Modificación genética de microorganismos que metabolizan pentosas y hexosas para la producción de etanol	11
<b>2. HIPÓTESIS</b>	15
<b>3. OBJETIVOS</b>	15
3.1 Objetivo General	15
3.2 Objetivos Específicos	15
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	16
<b>4.1 MATERIALES</b>	16
4.1.1 Reactivos	16
4.1.2 Cepas Bacterianas	17
4.1.3 Plasmidios	17
4.1.4 Partidores	17
4.1.5 Equipos	17
<b>4.2 MÉTODOS</b>	21
4.2.1 Cultivo Bacteriano	21
4.2.1.1 Cultivo de <i>Zymomonas mobilis</i>	21
4.2.1.2 Cultivo de células transformadas	21

4.2.1.3 Cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	21
4.2.2 Amplificación de los genes <i>pdg</i> y <i>adhB</i> de <i>Z. mobilis</i>	22
4.2.2.1 Purificación de DNA genómico de <i>Z. mobilis</i>	22
4.2.2.2 PCR	22
4.2.2.3 Análisis de clones recombinantes	23
4.2.3 Construcción del operón artificial	24
4.2.3.1 Construcción del promotor	24
4.2.3.2 Construcción del fragmento promotor-RBS- <i>pdg</i> -adp	26
4.2.3.2.1 Ligación del promotor con el gen <i>pdg</i>	27
4.2.3.3 Construcción del fragmento <i>pdg</i> -adaptador	28
4.2.3.4 Construcción del fragmento <i>adp2-adhB-term</i>	30
4.2.3.5 Construcción del fragmento <i>pdg</i> -adp- <i>adhB-term</i>	31
4.2.3.5.1 PCR	31
4.2.3.5.2 Ligación de los fragmentos <i>pdg</i> -adp y <i>adp2-adhB-term</i>	33
4.2.4 Análisis de secuencia de DNA	34
4.2.5 Determinación de la estabilidad del vector de expresión pPBAD-33 en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	34
4.2.5.1 Preparación de células electrocompetentes de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	34
4.2.5.2 Transformación por electroporación	35
4.2.5.3 Análisis de células transformadas	35
4.2.6 Placas indicadoras de aldehídos	36
<b>5. RESULTADOS</b>	37
5.1 Amplificación de genes <i>pdg</i> y <i>adhB</i> a partir de DNA genómico de <i>Z. mobilis</i>	37
5.2 Diseño y construcción de un operón artificial con los genes <i>pdg</i> y <i>adhB</i> de <i>Z. mobilis</i>	41
5.2.1 Diseño de operón productor de etanol (operón <i>pet</i> )	41
5.2.2 Construcción de operón <i>pet</i>	42
5.2.2.1 Diseño y construcción del promotor para el operón artificial	42
5.2.2.2 Amplificación promotor- <i>pdg</i> -adp	44
5.2.2.3 Ligación promotor-RBS- <i>pdg</i>	45



5.2.2.4 Construcción del fragmento <i>pdc</i> -adaptador	46
5.2.2.5 Construcción del fragmento <i>adp2-adhB</i> -term	49
5.2.2.6 Construcción del fragmento <i>pdc-adp-adhB</i> -term	51
5.2.2.6.1 PCR	51
5.2.2.6.2 Ligación de los fragmentos <i>pdc-adp</i> y <i>adp2-adhB</i> -term	53
5.3 Transformación de la cepa receptora <i>P. aeruginosa</i> PAO1	56
5.4 Análisis fenotípico de la actividad alcohol deshidrogenasa	57
<b>6. DISCUSIÓN</b>	58
<b>7. CONCLUSIONES</b>	62
<b>8. REFERENCIAS</b>	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de la organización de la pared celular de plantas	2
<b>Figura 2.</b> Ruta metabólica de la fermentación de etanol en <i>S. cerevisiae</i>	5
<b>Figura 3.</b> Vía lineal de Entner-Doudoroff en <i>Z. mobilis</i>	6
<b>Figura 4.</b> Ruta inicial de utilización de xilosa en bacterias y hongos	8
<b>Figura 5.</b> Ruta inicial de utilización de L-arabinosa en bacterias y hongos	10
<b>Figura 6.</b> Mapa del vector de clonamiento Strataclone pSC-A-amp/kan	23
<b>Figura 7.</b> Representación del PCR recursivo	26
<b>Figura 8.</b> Mapa del vector de clonación Strataclone Blunt pSC-B amp/kan	27
<b>Figura 9.</b> Esquema de la construcción del fragmento <i>pdc</i> -adp	29
<b>Figura 10.</b> Esquema de la construcción del fragmento <i>pdc</i> - <i>adhB</i> -term	31
<b>Figura 11.</b> Esquema de la construcción del fragmento <i>pdc</i> -RBS- <i>adhB</i> -term	33
<b>Figura 12.</b> Mapa del vector de expresión pBAD33	35
<b>Figura 13.</b> Separación electroforética de los productos de amplificación de los genes <i>pdc</i> y <i>adhB</i>	37
<b>Figura 14.</b> Análisis de clones transformados con pPD-A	38
<b>Figura 15.</b> Análisis de clones transformados con pAD-A	39
<b>Figura 16.</b> Secuencia y análisis del gen <i>pdc</i> de <i>Z. mobilis</i> CDBB-B-603	40
<b>Figura 17.</b> Secuencia y análisis del gen <i>adhB</i> de <i>Z. mobilis</i> CDBB-B-603	41
<b>Figura 18.</b> Diseño del operón etanológico para <i>P. aeruginosa</i> PAO1	42
<b>Figura 19.</b> Esquema del promotor diseñado	42
<b>Figura 20.</b> Producto del PCR recursivo	43
<b>Figura 21.</b> Secuenciación de prom28	44
<b>Figura 22.</b> Amplificación de la secuencia promotor-RBS- <i>pdc</i> -adp	45
<b>Figura 23.</b> Separación electroforética de los productos de amplificación <i>pdc</i> -adp	47
<b>Figura 24.</b> Análisis de clones transformados con pPD-B	48
<b>Figura 25.</b> Secuencia de la región 3' <i>pdc</i> -adp	49
<b>Figura 26.</b> Separación electroforética de los productos de PCR de pAD-A	50
<b>Figura 27.</b> Análisis de clones transformados con pAD-B	51
<b>Figura 28.</b> Secuencia de la región 5' y 3' del fragmento adp2- <i>adhB</i> -term	52

<b>Figura 29.</b> Separación electroforética de productos de PCR <i>pdc</i> -RBS- <i>adhB</i> -term	53
<b>Figura 30.</b> Análisis de los clones transformados con pSC-B que contiene el producto de ligación de los fragmentos <i>pdc</i> -adp y <i>adp2-adhB</i> -term	55
<b>Figura 31.</b> Transformación de la cepa receptora <i>P. aeruginosa</i> PAO1	56
<b>Figura 32.</b> Análisis fenotípico de la actividad alcohol deshidrogenasa mediante detección directa en placas con indicador para aldehídos	57
<b>Figura 33.</b> Esquema de la organización del operón artificial contenido en la construcción pCL27-B	61

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición de la pared celular de varias fuentes consideradas para biocombustible	3
<b>Tabla 2.</b> Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo	17
<b>Tabla 3.</b> Plasmidios utilizados en este trabajo	18
<b>Tabla 4.</b> Secuencia de los partidores utilizados en este trabajo	19
<b>Tabla 4.</b> Secuencia de los partidores utilizados en este trabajo. Continuación	20
<b>Tabla 5.</b> Equipos utilizados en este trabajo	21
<b>Tabla 6.</b> Resultado de análisis por PCR del plasmidio pCL27-B	56

## ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
<b>ADH</b>	Alcohol deshidrogenasa
<b>Amp</b>	Ampicilina
<b>Aprox</b>	Aproximadamente
<b>BLASTn</b>	Basic Local Alignment Search Tool nucleotide
<b>Cm</b>	Cloranfenicol
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTPs</b>	Desoxiribonucleótidos trifosfato
<b>IPTG</b>	Isopropil-tio- $\beta$ -D-galactopiranosido
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDC</b>	Piruvato descarboxilasa
<b>Tm</b>	Temperatura de melting
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido

## RESUMEN

Los problemas ambientales y la disminución de las reservas de petróleo han reiniciado la búsqueda de combustibles alternativos a los combustibles fósiles. El etanol se presenta como una alternativa sustentable para resolver esta problemática.

En la naturaleza existen microorganismos silvestres productores de etanol, tales como la bacteria *Zymomonas mobilis* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Si bien estos dos microorganismos son altamente eficientes en la generación de etanol, sólo son capaces de utilizar azúcares de 6 carbonos, limitando la producción industrial de etanol solo a materias primas que contengan hexosas.

En los residuos lignocelulósicos se encuentra una gran reserva de hidratos de carbono almacenada como polímeros de glucosa (celulosa) o azúcares de 5 carbonos como xilosa y arabinosa.

Para el aprovechamiento de pentosas disponibles en esta materia prima se han modificado estos microorganismos, mediante la introducción de los genes de las enzimas necesarias para metabolizar arabinosa y xilosa o se han incorporado los genes de las enzimas de la ruta etanológica de *Z. mobilis*, piruvato descarboxilasa (*pdh*) y alcohol deshidrogenasa II (*adhB*) a bacterias capaces de utilizar pentosas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* y *Bacillus subtilis*.

El género *Pseudomonas*, principalmente *Pseudomonas aeruginosa*, posee muchas de las características necesarias para la producción industrial de etanol, es una versátil bacteria Gram negativo, capaz de adaptarse y sobrevivir bajo amplio rango de condiciones ambientales y al igual que *Z. mobilis* asimila azúcares por la ruta de Entner-Doudoroff, además posee una tolerancia a etanol mayor que bacterias *E. coli* recombinantes utilizadas en la producción de etanol.

El objetivo general de este trabajo es la construcción de un operón productor de etanol para la expresión de los genes *pdh* y *adhB* de la ruta etanológica de *Z. mobilis* en *P. aeruginosa* PAO1.

El diseño del operón artificial incluyó los siguientes elementos genéticos: el promotor del operón inducible arabinosa ( $P_{BAD}$ ), sitio de unión a ribosoma (RBS), gen *pd*c, gen *adh*B y un terminador transcripcional para *P. aeruginosa*.

Las primeras etapas para la construcción del operon *pet*, contemplaron la realización de 2 construcciones genéticas mediante PCR. La primera comprende la mínima región codificante del gen *pd*c y una región adaptadora de 33 pb (adp), la segunda corresponde a la unión de adp2 (secuencia que contiene una zona complementaria a adp y un sitio de unión a ribosoma) con la mínima región codificante del gen *adh*B y un terminador transcripcional específico para *Pseudomonas*.

Los análisis de restricción, PCR y secuenciación mostraron la obtención de un fragmento 1740 pb correspondiente al producto *pd*c-adp, un fragmento de 1247 pb para el producto adp2-*adh*B-term. Para los productos de PCR de la fusión de las construcciones *pd*c-adp con adp2-*adh*B-term se obtuvieron amplicones inespecíficos de tamaños superiores e inferiores al tamaño teórico esperado (3 Kb). De manera alternativa para la obtención de la construcción que contenga los genes *pd*c y *adh*B con la secuencia adaptadora y de unión a ribosoma, se realizaron reacciones de ligación de ambos fragmentos utilizando la enzima T4 DNA ligasa, las cuales fueron clonadas en el vector pSC-B. De todos los clones analizados solo uno contenía la construcción esperada (plasmidio pCL27-B), pero los análisis de PCR revelaron que los genes no se encontraban en la orientación adecuada, por lo tanto no fue posible obtener la construcción del fragmento *pd*c-adp-RBS-*adh*B, construcción clave en el término de la construcción del operón *pet*.

## ABSTRACT

Environmental problems and declining oil reserves have resumed the search for alternative fuels to fossil fuels. Ethanol is presented as a sustainable alternative to solve this problem.

In nature there are wild ethanol producing microorganisms, such as bacteria *Zymomonas mobilis* and yeast *Saccharomyces cerevisiae*. While these two microorganisms are highly efficient in the generation of ethanol, are capable of using only 6 carbon sugars, limiting the industrial production of ethanol only to raw material containing hexoses.

In lignocellulosic waste there is a large reservoir of stored carbohydrates like glucose polymers (cellulose) or 5-carbon sugars such as xylose and arabinose.

For the utilization of available pentoses in this raw material, such microorganisms have been modified by the introduction of genes of the necessary enzymes to metabolize arabinose and xylose or enzymes genes have been incorporated of etanologic pathway from *Z. mobilis*, pyruvate decarboxylase (*pdh*) and alcohol deshidrogenasa II (*adhB*) to bacteria capable to use pentoses, such as *Escherichia coli*, *Klebsiella oxycota*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* and *Bacillus subtilis*.

The genus *Pseudomonas*, mainly *Pseudomonas aeruginosa*, has many of the features needed for industrial production of ethanol, is a versatile Gram negative bacteria, able to adapt and survive under wide range of environmental conditions and like *Z. mobilis* assimilated sugars by the Entner-Doudoroff pathway, and in addition has ethanol higher tolerance than recombined *E. coli* bacteria used in the production of ethanol.

The overall aim of this work is the construction of an ethanol producer operon for the expression of *pdh* and *adhB* genes from the *Z. mobilis* etanologic pathway on *P. aeruginosa* PAO1.

The artificial operon design included the following genetic elements: the arabinose inducible operon promoter ( $P_{BAD}$ ), ribosome binding site (RBS), *pdh* gene, *adhB* gene and a transcriptional terminator to *P. aeruginosa*.



The first step to construct the pet operon, contemplated 2 genetic constructs by PCR. The first involves a *pdc* gene minimum coding region and a adapter region of 33 bp (adp), the second corresponds to the union of adp2 (sequence that contains a complementary zone to adp and a ribosome binding site) with *adhB* gene minimal encoding region and a specific transcriptional terminator to *Pseudomonas*.

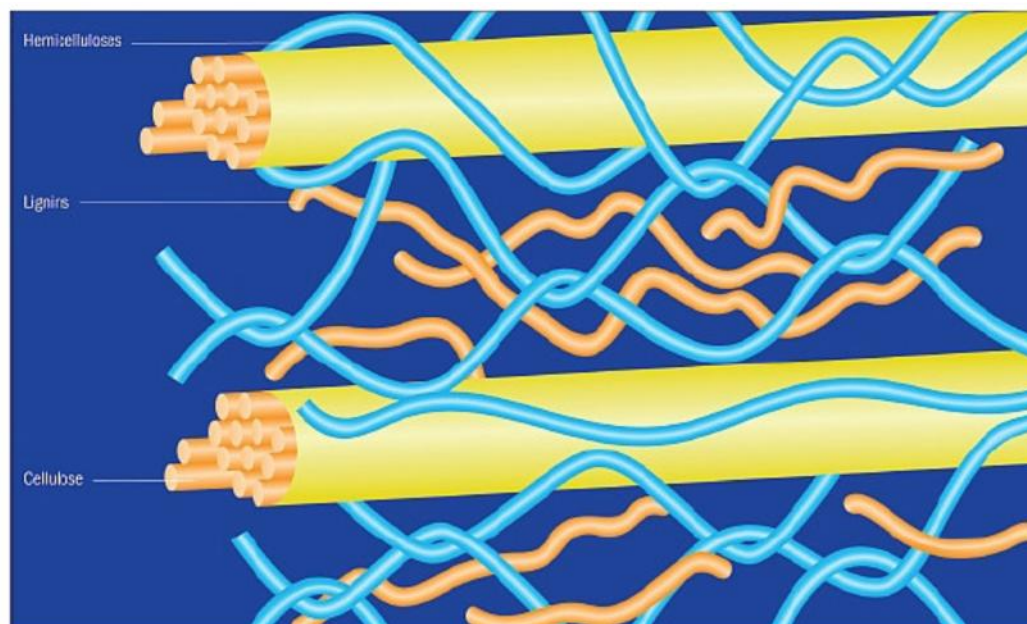
The restriction analysis, PCR and sequencing showed the obtention of a 1740 pb fragment corresponding to the *pdc*-adp product, a 1247 pb fragment for the product adp2-*adhB*-term. For the PCR products of *pdc*-adp and adp2-*adhB*-term construction fusion, non specific amplicons were obtained in higher and lower sizes than the theoretical size expected (3 Kb). Alternatively for the obtention of the construction which have the *pdc* and *adhB* genes with the adapter sequence and ribosome binding, ligation reactions were performed of both fragments using T4 DNA ligase enzyme, which were cloned on the vector pSC- B. Of all the clones analyzed just one contained the expected construction (plasmid pCL27-B), but PCR analysis revealed that genes were not in the proper orientation, therefore it was not possible to obtain the construction of fragment *pdc*-adp-RBS-*adhB*, key construction in the completion of the pet operon construction.

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existe una gran dependencia de los combustibles fósiles, sin embargo este escenario no será sostenible por un largo tiempo, debido a la disminución de las reservas de petróleo. Se estima que estas reservas se agotarán para el año 2043, a lo que se suma el deterioro ambiental generado por un aumento en las emisiones de gases de efecto invernadero producto del uso excesivo de combustibles fósiles. Este dramático escenario, ha impulsado la búsqueda de tecnologías sostenibles para el reemplazo del petróleo como fuente de combustible. Las alternativas más promisorias son los denominados biocombustibles, los cuales han sido definidos como aquellos combustibles líquidos o gaseosos destinados al sector de transporte, producidos a partir de materias primas biológicas o biomasa no comestible **(Sivasamy y cols, 2008; Centi y cols, 2008)**.

El etanol se ha catalogado como la alternativa energética más atractiva dado que: es un combustible renovable, virtualmente utilizable en la inmensa mayoría de los motores de combustión interna, aumenta el octanaje de combustibles convencionales a un bajo costo y contribuye a la reducción de gases efecto invernadero **(Wheals y cols, 1999; Mielenz, 2001)**. Actualmente el suministro global de etanol es producido principalmente por dos países, Brasil y Estados Unidos de América. En Brasil, el etanol es usualmente producido a partir de caña de azúcar, mientras que en USA es obtenido a partir de almidón, proveniente de cultivos del maíz. El uso de materia prima procedente de cultivos comestibles para la producción de etanol (etanol de primera generación) es controversial, debido a que el costo de esta encarece el precio final del biocombustible, haciéndolo menos competitivo frente a los combustibles derivados del petróleo. Además, el aumento en la demanda por materias primas comestibles produce un alza en el precio de los alimentos derivados de estos cultivos. La opción más prometedora a mediano plazo, es el uso de biomasa lignocelulósica para la producción etanol a bajos costos (etanol de segunda generación), posibilitando que este producto sea adoptado por la industria y deje de competir con los productos alimenticios **(Elobeid y Hart, 2007)**.

El material lignocelulósico está compuesto principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y que posee regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Béguin y Aubert, 1994; Howard y cols, 2003). La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas, unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 y ocasionalmente por enlaces  $\beta$ -1,3 (Sun y Chen, 2002). La lignina es en cambio un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos y es altamente resistente a la degradación química y biológica (Chandel y cols, 2011) (Figura 1). Dependiendo la materia prima utilizada podemos encontrar diferencias entre el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina (Tabla 1).



**Figura 1. Esquema de la organización de la pared celular de plantas, en café fibrillas de celulosa laminada con hemicelulosa (turquesa) y polímeros de lignina (naranja).** Tomada de Chandel y cols, 2011.

En Chile sólo la industria primaria de la madera (aquella que realiza la primera transformación de la troza o rollizo, producida principalmente en aserraderos), genera 3.253.724

ton/año de residuos lignocelulósicos, indicando que sería una fuente de materia prima sostenible para la producción de etanol en Chile (CNE, INFOR y GETZ, 2007).

Cabe destacar que el 25% de las azúcares provenientes de esta materia prima son pentosas, por lo tanto ha sido de suma importancia el desarrollo de microorganismos capaces de fermentar etanol a partir de estas, ya que los microorganismos que naturalmente presentan una fermentación etanológica, solo lo hacen a partir de hexosas.

**Tabla 1.** Composición de la pared celular de varias fuentes consideradas para biocombustible (% de material seco). Adaptado de Chandel y cols, 2011.

Fuente lignocelulósica	Celulosa		Hemicelulosa			Lignina
	Glucosa	Xilosa	Arabinosa	Manosa	Galactosa	
Bagazo de caña de azúcar	40.2	22.5	2.0	0.5	1.4	25.2
Paja de trigo	32.1	19.5	2.8	0.6	1,1	20
Rastrojo de maíz	37.5	21.7	2.7	0.6	1.6	18.9
Switch grass	34.2	22.8	3.1	0.3	1.4	19.1
Madera de pino	44.8	6.0	2.0	11.4	1.4	29.5
Madera de álamo	48.6	17.0	0.5	2.1	2.0	21.4
Madera de abeto	41.9	6.1	1.2	14.3	1.0	27.1
<i>Saccharum spontaneum</i>	36.81	21.5	2.16	0.16	0.72	20.3
Madera de salix	41.5	15.0	1.8	3.0	2.1	25.2
Madera de abeto de Douglas	46.1	3.9	1.1	14.0	2.7	27.3

### 1. 1 Microorganismos silvestres productores de Etanol

En la naturaleza, los dos principales microorganismos productores de etanol son *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* (Bai y cols, 2008).

*S. cerevisiae* es utilizada preferentemente para la producción industrial de etanol a partir de caña de azúcar y maíz. Su principal ruta metabólica es la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Figura 2), a través de la cual una molécula de glucosa es metabolizada para producir dos moléculas de piruvato que bajo condiciones anaeróbicas son reducidas a etanol con la liberación de CO<sub>2</sub>, por la acción de las enzimas piruvato descarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADH) (Madigan y cols, 2000).

Otro microorganismo productor de etanol es *Z. mobilis*, bacteria anaeróbica Gram negativo, que ha sido aislada principalmente en países tropicales y subtropicales como México, Brasil y

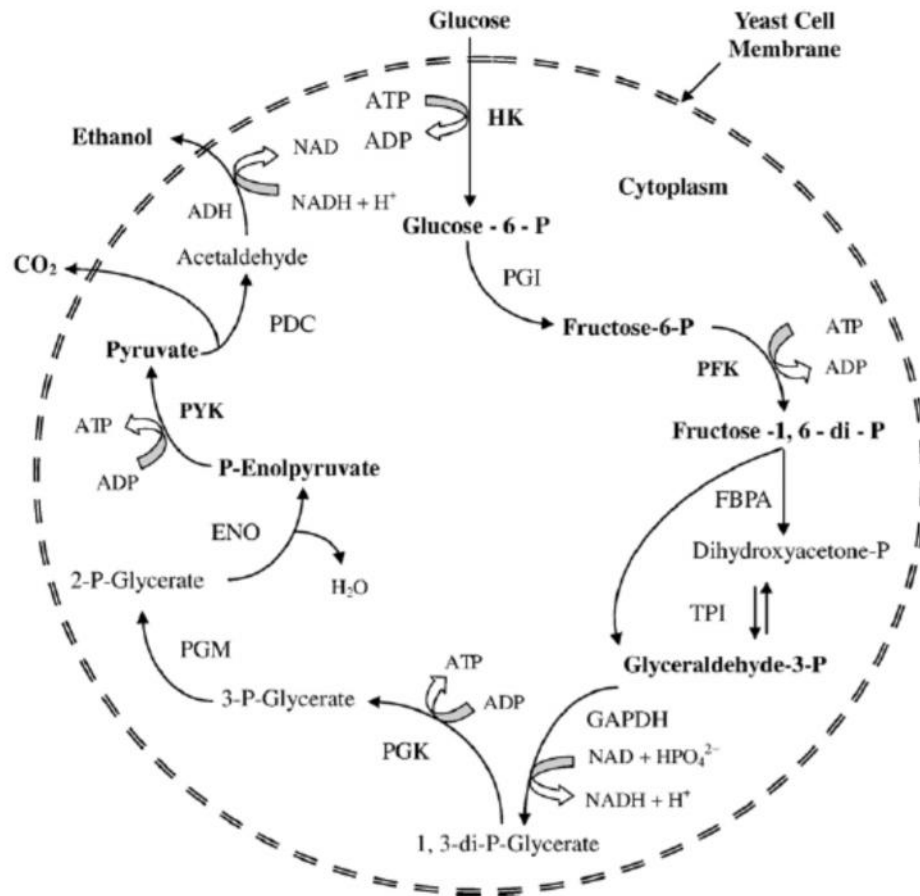
África central. Fue descubierta en 1922 en pulque y vino de palma. **(Lindner, 1928; Swings y De Ley, 1977; Falcao de Morais y cols, 1993)**. Este microorganismo produce etanol a partir de glucosa mediante la ruta Entner- Doudoroff (ED) en conjunto con las enzimas PDC y ADH **(Figura 3)**.

La enzima PDC es central para la fermentación a homoetanol en ambos microorganismos y cataliza la descarboxilación no oxidativa de piruvato a acetaldehído con la liberación de dióxido de carbono, el acetaldehído generado de esta reacción es reducido a etanol por la enzima ADH. **(Conway y cols, 1987 a Wills y cols, 1981; Hoppner y Doelle, 1983)**

*Z. mobilis* tiene dos isoenzimas de alcohol deshidrogenasa (ADH), que catalizan la reducción del acetaldehído a etanol, acompañado por la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>. La isoenzima I (ADHA) contiene Zn en su sitio activo y posee una masa molecular entre 34 y 40 kDa. La isoenzima II (ADHB) tiene Fe, en lugar de Zn, en su sitio activo y su masa molecular es de 40,1 kDa. Aunque la ADHB es la isoenzima más abundante en *Z. mobilis*, ambas parecen contribuir durante la fermentación **(Wills y cols, 1981; Kinoshita y cols, 1985; Conway y cols, 1987b)**.

*Z. mobilis* y *S. cerevisiae* producen etanol por rutas metabólicas distintas, teniendo como consecuencia una productividad diferencial de etanol en ambos microorganismos. En *Z. mobilis* la productividad teórica de etanol a partir de glucosa es superior al 97%, mientras que para *S. cerevisiae* solo alcanza entre el 90-93%. Esto se explica debido a que en la ruta ED solo se genera una molécula de ATP por molécula de glucosa, asegurando un alto flujo de glucosa por esta ruta y una menor producción de biomasa, siendo más carbono canalizado para la fermentación de etanol **(Sprenger, 1996)**.

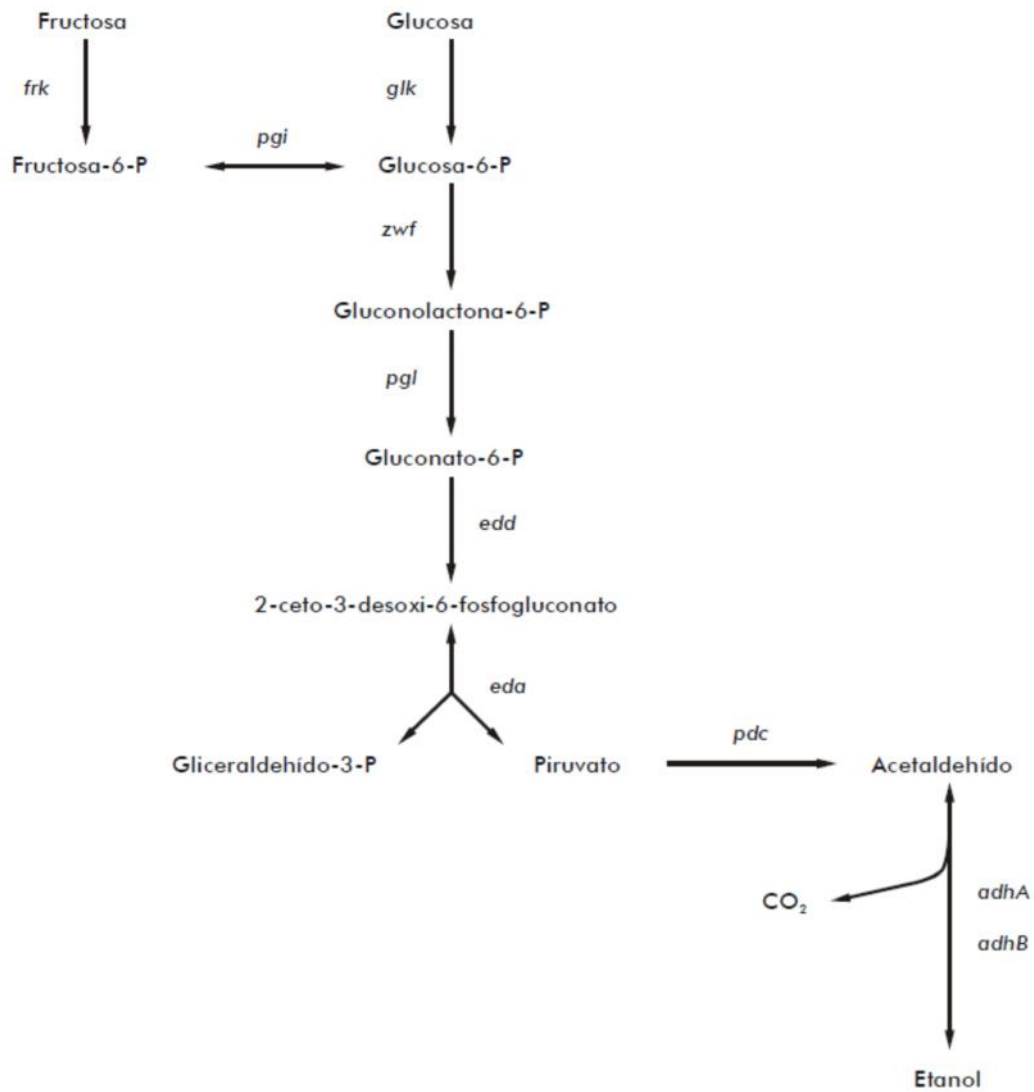
A pesar de esta ventaja, *Z. mobilis* no es adecuada para la producción industrial de etanol, debido a que esta especie tiene un bajo espectro de sustratos específicos, que incluyen solo 3 azúcares: D-glucosa, D-fructosa y sacarosa **(Yan y Liao, 2009; Sprenger, 1996)**.



**Figura 2. Ruta metabólica de fermentación de etanol en *S. cerevisiae*.** Abreviaturas: HK, hexokinasa; PGI, fosfoglucoisomerasa; PFK, fosfofrutokinasa; FBPA, fructosa bisfosfato aldolasa; TPI, triosa fosfato isomerasa; GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; PGK, fosfogliceraldehído kinasa; PGM, fosfoglicero mutasa; ENO, enolasa; PYK, piruvato kinasa; PDC, piruvato descarboxilasa; ADH, alcohol deshidrogenasa. Tomada de Bai y cols., 2008.

## 1.2 Organismos recombinantes para la producción de etanol

Como se mencionó anteriormente, en la actualidad el mayor porcentaje de bioetanol producido es el denominado de primera generación (caña de azúcar en Brasil y glucosa de almidón de maíz en EUA), provocando una competencia entre la producción de cultivos destinados para la producción de biocombustibles y los destinados usualmente a alimentación.



**Figura 3. Vía lineal de Entner-Doudoroff en *Z. mobilis*.** Abreviaturas: *frk*, fructocinasa; *pgi*, glucosa - 6-fosfato isomerasa; *glk*, glucocinasa; *zwf*, glucosa 6-P-deshidrogenasa; *pgl*, 6-fosfogluconolactonasa; *edd*, gluconato-6-fosfato deshidratasa; *eda*, 2-ceto-3-desoxi-6 fosfogluconato aldolasa; *pdc*, piruvato descarboxilasa; *adhA* alcohol deshidrogenasa 1, *adhB*, alcohol deshidrogenasa II. Tomada de García y Ponce, 2003.

Pero como se señaló también, existen grandes cantidades de azúcares disponibles en la biomasa de plantas, en forma de celulosa (glucosa), hemicelulosa (xilosa y arabinosa) y lignina. Por lo tanto, para el aprovechamiento de esta biomasa se necesitan microorganismos capaces de generar etanol a partir de hexosas y pentosas. Es por esto que en las últimas décadas se han

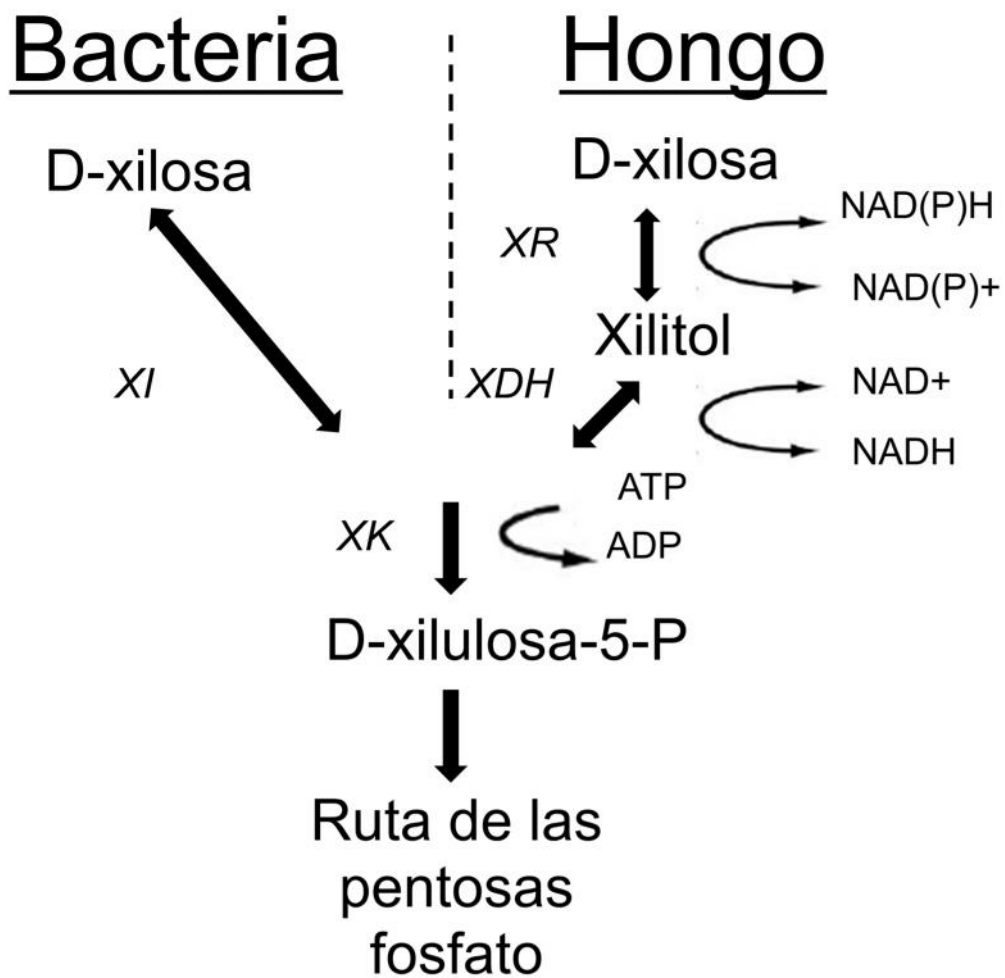
construido numerosos microorganismos recombinantes capaces de fermentar mezclas de azúcar (pentosas y hexosas) selectivamente a etanol, ya sea por la introducción de genes para la degradación de pentosas a organismos que naturalmente producen etanol o mediante la introducción de los genes de las enzimas PDC y ADH a organismos capaces de metabolizar azúcares más complejas (Dien y cols, 2003).

### 1.2.1 Modificación genética de *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* para la metabolización de pentosas

*Saccharomyces cerevisiae* es altamente eficiente para la producción de etanol a partir de azúcares de 6 carbonos, pero incapaz de utilizar pentosas. En la **figura 4**, se muestran las reacciones enzimáticas necesarias para la asimilación de xilosa, tanto en bacterias como en hongos. En primer lugar D-xilosa es reducida a xilitol por D-xilosa reductasa (XR) y subsecuentemente oxidada a D-xilulosa por la enzima xilitol deshidrogenasa (XDH) para formar D-xilulosa -5-fosfato, que es transformado en gliceraldehído-3-P y fructosa-6-P por la vía no oxidativa de las pentosas fosfato, para llegar a la formación de etanol por la ruta EMP (Chandel y cols, 2011).

En *S. cerevisiae* los genes necesarios para la asimilación de xilosa se encuentran presentes, pero no alcanzan los niveles adecuados de expresión para una significativa asimilación de este azúcar. Las principales modificaciones que se han realizado a este microorganismo fueron la expresión heteróloga de las enzimas xilulosa isomerasa (XI), XR y XDH tomadas de microorganismos como *Thermus thermophilus* para XI (Walfridsson y cols, 1996) o los genes *xyl1* y *xyl2* de la levadura *Pichia stipitis* que codifican para las enzimas XR y XDH (Walfridsson y cols, 1997). En el caso de XI de *T. thermophilus* no se obtuvo una expresión significativa de la enzima atribuido posiblemente a un mal plegamiento de la proteína y al gran efecto inhibitorio de xilitol sobre esta enzima (Gárdonyi y Hahn-Hägerdal, 2003). En el caso de XR y XDH de *P. stipitis* se produjo una baja cantidad de etanol debido a la predilección de cofactor requerido por XR, ya que prefiere NADPH en lugar de NADH, impidiendo una recircularización de cofactores entre el primer y segundo paso de la ruta, teniendo como consecuencia una acumulación de xilitol (Rizzi y cols, 1988).





XI	– xilosa isomerasa
XR	– xilosa reductasa
XDH	– xilitol deshidrogenasa
XK	– xilulokinasa

**Figura 4. Ruta inicial de utilización de xilosa en bacterias y hongos.** Adaptado de Chandel y cols., 2011.

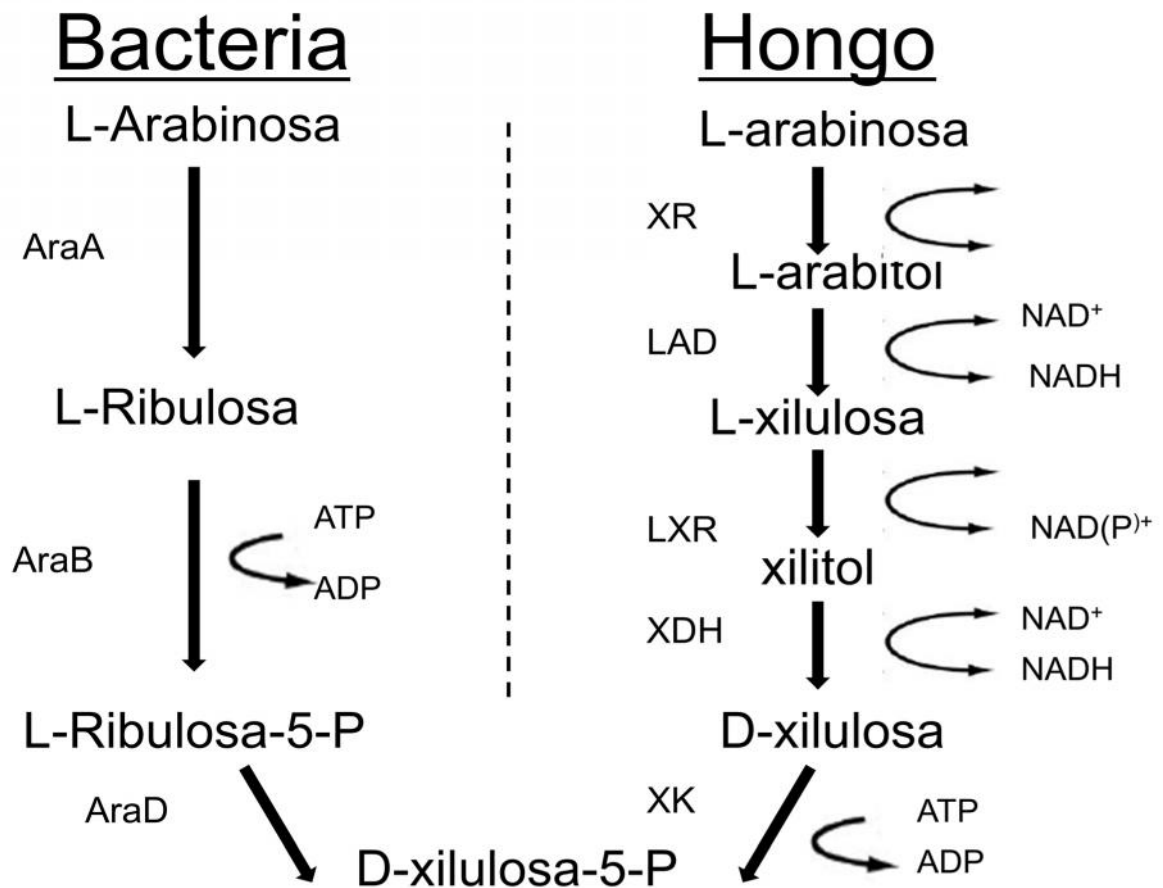
La enzima xilulokinasa (XK) en *S. cerevisiae* (XKS1) ha sido sobreexpresada estimulando la utilización de Xilosa bajo condiciones aeróbicas. Por lo tanto, con estas modificaciones se logró

desarrollar una levadura que fermenta xilosa, en donde los genes *xyl1*, *xyl2* y *xks1* se integraron en el cromosoma bajo un promotor PGK1 de *S. cerevisiae* para obtener una transformante estable designada *S. cerevisiae* TMB3001, la cual es capaz de fermentar glucosa y xilosa en etanol, aunque en una baja producción a escala de laboratorio (**Eliasson y cols, 2000b**). Sí bien, se han logrado cepas recombinantes capaces de fermentar etanol a partir de xilosa, para comercializar etanol a partir de material lignocelulósico se necesitan cepas de levadura que puedan crecer vigorosamente sobre xilosa, fermentar rápidamente y tolerar ácidos y otros inhibidores a nivel industrial. A la fecha se han realizado muchas modificaciones a *S. cerevisiae* para mejorar el flujo que xilulosa-5-P a la ruta de las pentosas fosfato, como deleciones de algunas enzimas de las reacciones oxidativas de la ruta de las pentosas fosfato (**Jeppsson y cols, 2002**), introducción de enzimas transhidrogenasas (enzimas que catalizan la reacción de transhidrogenación entre las coenzimas NADH y NADPH), pero a la fecha aún no se incorporan estas modificaciones a cepas industriales (**Nissen y cols, 2001**).

La utilización de arabinosa es mas reciente debido a que en el material lignocelulósico se encuentra en un menor porcentaje con respecto a las cantidades de xilosa, dependiendo de la materia prima utilizada (**Tabla1**). Las reacciones enzimáticas iniciales para la utilización de arabinosa en bacterias y hongos se presentan en la **Figura 5**.

Para la introducción de esta ruta en *S. cerevisiae* se realizó la expresión heteróloga de la ruta completa de *Escherichia coli*, no obteniéndose una expresión funcional de la enzima L-arabinosa isomerasa (AraA), por lo tanto se sustituyó este gen por el de una L-arabinosa isomerasa de *Bacillus subtilis* obteniéndose una ruta funcional. Esta modificación sumada a la introducción de una copia adicional del transportador galactosa permeasa (*gal2*), permitieron que esta cepa recombinante de *S. cerevisiae* fuera capaz de crecer sobre arabinosa como única fuente de carbono (**Becker y Boles, 2003**).

La ruta en hongos también ha sido introducida en *S. cerevisiae*, combinando enzimas de *P. stipitis* y del hongo filamentoso *Trichoderma reesei*. Si bien las enzimas fueron activamente expresadas no hubo un apreciable crecimiento en arabinosa ni una producción significativa de etanol. Esta escasa producción de etanol por *S. cerevisiae* recombinante se puede atribuir a un desbalance oxido-reducción, debido a la falta de co-factores reducidos (**Richard y cols, 2003**).



AraA – L-arabinosaisomerasa  
 AraB – L-Ribulokinasa  
 AraD – L-ribulosa-5-fosfato 4-epimerasa  
 XR – xilosa (aldosa) reductasa  
 LAD – L-arabinitol 4-deshidrogenasa  
 LXR – L-xilulosa reductasa  
 XDH – xilitol deshidrogenasa  
 XK – xilulokinasa

**Figura 5. Ruta inicial de utilización de L-arabinosa en bacterias y hongos.** Adaptado de Hahn-Hägerdal y cols, 2007.

Por otra parte, en *Z. mobilis* se han introducido los genes de las enzimas necesarias para formar intermediarios para la ruta de Entner Doudoroff a partir de xilosa y arabinosa.

Para la fermentación de xilosa se han incorporado los genes para las enzimas xilosa isomerasa (*xylA*) y xilulokinasa (*xylB*) de *Klebsiella pneumoniae* y los genes para las enzimas transaldolasa (*talB*) y transcetolasa (*tkl*) de *E. coli* necesarios para formar intermediarios para la ruta ED. Las principales limitaciones de estas cepas recombinantes han sido la baja actividad obtenida de las enzimas XI y XK (**Zhang y cols, 1995**).

Para la utilización de arabinosa se han construido cepas recombinantes de *Z. mobilis* mediante la introducción de 5 genes de *E. coli* que codifican para las enzimas L-arabinosa isomerasa (*araA*), L-ribulokinasa (*araB*), L-ribulosa-5-fosfato-4-epimerasa (*araD*), transaldolasa (*talB*) y transcetolasa (*tklA*). Las tres primeras enzimas son necesarias para la conversión de arabinosa en xilulosa-5-P y las enzimas transaldolasa y transcetolasa para transformar xilulosa-5-P en intermediarios para la ruta ED. Estos genes fueron expresados en un plasmidio bajo la expresión de promotores de enolasa o gliceraldehído-3-P deshidrogenasa, ambos promotores fuertes y constitutivos. La principal limitación de esta cepa recombinante fue la falta de estabilidad del plasmidio que transporta los genes del operón arabinosa (después de 20 generaciones) (**Deanda y cols, 1996**).

Posteriormente, se construyó una cepa recombinante de *Z. mobilis* que tiene integrado en su genoma los 7 genes esenciales para co-fermentar glucosa, xilosa y arabinosa, denominada AX101. Los resultados mostraron una producción de etanol comparable con otras cepas *Z. mobilis* recombinantes reportadas previamente y un mínimo de formación de subproductos haciendo que AX101 sea atractiva para procesos industriales (**Mohagheghi y cols, 2002**).

### **1.2.2 Modificación genética de microorganismos que metabolizan pentosas y hexosas para la producción de etanol.**

En la literatura se ha descrito la introducción de genes de las enzimas PDC y ADH tanto en bacterias Gram negativo como Gram positivo. En bacterias Gram negativo los genes *pdh* y *adhB* de *Z. mobilis* han sido introducidos en bacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* M5A1 y bacterias Gram positivo como *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* y *Bacillus subtilis* para la producción de etanol a partir de xilosa y glucosa (**Dien y cols, 2003; Talarico y cols, 2005**).

Para la introducción de los genes de las enzimas PDC y ADH en *E. coli* se construyó un operón artificial con los genes *pdh* y *adhB* de *Z. mobilis*, bajo la expresión de un promotor *lac*, denominado operón *pet* (productor de etanol), el cual ha sido modificado para la introducción de la ruta etanológica de *Z. mobilis* en otras bacterias (**Ingram y cols, 1987; Ohta y cols, 1991a, 1991b**).

En el caso de *E. coli* se desarrolló una cepa que contiene este operón integrado en su genoma denominada *E. coli* KO11, esta cepa alcanzó una productividad de etanol correspondiente al 95% de la producción teórica, pero presentó una baja tolerancia a etanol comparada a las levaduras utilizadas comúnmente en producción industrial de etanol (inferior a 35 gL<sup>-1</sup>). Para mejorar esta condición *E. coli* KO11 se sometió a 3 meses de evolución metabólica que consistió en transferencias de medio líquido a concentraciones crecientes de etanol y selección sobre medio sólido. El producto final de esta selección fue una cepa capaz de crecer en 50 gL<sup>-1</sup> de etanol, denominada LYO1. (**Ohta y cols, 1991a; Yomano y cols, 1998**). La principal limitación de estas cepas fue la costosa suplementación nutricional requerida para conseguir una alta productividad de etanol, debido a que esta era alcanzada solo utilizando medios ricos para la fermentación.

Como *E. coli*, *Klebsiella oxycota* es capaz de metabolizar una gran variedad de azúcares, también ha sido expresado en esta bacteria el *pet* operón, el cual más tarde se integró en su genoma, resultando una cepa denominada P2, a la cual se eliminó la ruta de butanodiol generándose una cepa denominada BW21, cuya productividad de etanol es de 40 gL<sup>-1</sup> en 48 horas en medio OUM1 (medio diseñado específicamente para *K. oxycota* que contiene maceración de licor de maíz, sales minerales y urea como única fuente de nitrógeno) (**Ohta y cols, 1991b**).

Otro grupo de bacterias capaces de utilizar un amplio rango de sustratos y crecer bajo condiciones adversas son las bacterias Gram positivo productoras de ácido láctico, particularmente *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactococcus lactis*. Estas bacterias fueron transformadas con dos variaciones del operón *pet* que contienen señales de expresión apropiadas para bacterias ácido láctico. La actividad de PDC y ADH de estas transformantes Gram positivo fue significativamente más baja que en las transformantes *E. coli*

utilizadas como control. En la evaluación de la fermentación de glucosa por las cepas transformadas se observó que *L. plantarum* produce pequeñas cantidades de etanol (2,9-3,0 mM), esto se debe a una insuficiente expresión de los genes PDC y ADH para una significativa producción de etanol (Gold y cols, 1996; Nichols y cols, 2003).

Otros investigadores apuestan que *Bacillus subtilis* puede ser un buen candidato para la producción de etanol, debido a que generalmente es reconocido como un organismo seguro y metaboliza un extenso rango de azúcares. Este microorganismo bajo condiciones fermentativas produce lactato, acetato, butanediol y trazas de etanol a partir glucosa. Por lo tanto se modificó la ruta heterofermentativa de *B. subtilis* para la homofermentación de etanol. Para esto se inactivó el gen de la enzima lactato deshidrogenasa (*ldh*), responsable de la producción de lactato, integrando vía cromosomal los genes *pdh* y *adhB* de *Z. mobilis* y mediante la interrupción de la ruta de síntesis de butanediol por la inserción del gen de la enzima transhidrogenasa (*udhA*) de *E. coli* en el locus *alsS* (acetolactato sintasa: una de las enzimas responsable de la síntesis de acetona, un precursor de butanediol). La producción de etanol de este microorganismo recombinante fue del 88% de la máxima producción teórica por glucosa consumida en 48 hrs, pero la velocidad de consumo de glucosa fue baja. Esto se puede explicar debido a que la inactivación de *ldh* tuvo efectos negativos sobre la velocidad de crecimiento de *B. subtilis* bajo condiciones fermentativas, con lo cual se hipotetiza el rol que puede tener en el balance NADPH/NADP<sup>+</sup>. Por lo tanto el desarrollo de un microorganismo etanológico derivado de una bacteria Gram positivo, puede requerir el uso de otras actividades enzimáticas, así como actividad transhidrogenasa, o la directa evolución de actividad ADH para que pueda compensar el rol de LDH en el metabolismo de bacterias Gram positivo, o estrategias metabólicas para reducir la generación de NADPH en el catabolismo de glucosa (Romero y cols, 2007).

Se puede concluir que la producción de etanol de estas bacterias modificadas ha sido mejor en bacterias Gram negativo, debido a que el gen *pdh* de *Z. mobilis* (bacteria Gram negativo) no es bien expresado en bacterias Gram positivo. Para aumentar el pool disponible de PDC en estas bacterias, se ha incorporado el gen de la enzima PDC de la bacteria Gram positivo *Sarcinia ventriculi* en *Bacillus megaterium*. Si bien la enzima PDC de *S. ventriculi* fue

sintetizada en altos niveles, su  $K_M$  por piruvato es 10 veces más alta que en PDC de otras especies (**Raj y cols, 2002; Talarico y cols, 2005**).

En resumen, el microorganismo ideal para la fermentación eficiente de etanol a partir de residuos lignocelulósicos debe tener presente las siguientes consideraciones: amplio rango de utilización de sustratos, alta productividad de etanol, mínima formación de subproductos, alta tolerancia a etanol, tolerancia a cambios de pH y temperatura, mínima suplementación nutricional entre otras (**Picataggio y Zhang, 1996**).

En la búsqueda de nuevos microorganismos modificables para la producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos, el género *Pseudomonas*, principalmente *Pseudomonas aeruginosa*, se presenta como una candidata prometedora.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo principal de este trabajo es la construcción de un operón artificial para la expresión de la ruta etanológica de *Z. mobilis* en la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. La cepa *P. aeruginosa* PAO1 posee muchas de las características necesarias para la fermentación industrial de etanol a partir de materias primas lignocelulósicas: es una versátil bacteria Gram negativo, utiliza un amplio rango de compuestos orgánicos e inorgánicos y es capaz de vivir bajo diversas condiciones ambientales ( **Palleroni, 2005; Yahr y Parsek, 2006**), lo que supone la haría capaz de resistir las condiciones adversas y subproductos tóxicos para otros microorganismos generados en la fermentación de etanol, además utiliza xilosa y arabinosa como fuente de carbono (**Elrod y Braun, 1942**) y posee una tolerancia a etanol de 36,8 g/L (datos de nuestro Laboratorio), mayor que *E. coli* KO11 (**Yomano y cols, 1998**), *E. coli* ET1 (**Wang y cols, 2008**), *E. coli* B y *E. coli* S2420 (**Zhou y cols, 2008**), descritas en la literatura.

Por otra parte, al igual que *Z. mobilis*, asimila azúcares y ácidos orgánicos preferencialmente a través de la ruta de Entner-Doudoroff, lo que presume que la introducción de la ruta etanológica de *Z. mobilis* alcanzaría altos niveles de producción de etanol (**Eisenberg y cols, 1974; García y Ponce 2003**). Además el genoma de *P. aeruginosa* PAO1, se encuentra secuenciado lo que facilita su manipulación genética. (**Stover y cols, 2000**).

## **2. HIPÓTESIS:**

Dada las características metabólicas de *P. aeruginosa* es posible configurar una ruta metabólica etanológica mediante la construcción de un operón artificial que contenga las señales adecuadas para la expresión de los genes que codifican para las enzimas piruvato descarboxilasa (*pdh*) y alcohol deshidrogenasa (*adhB*) de *Zymomonas mobilis*.

## **3. OBJETIVOS:**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Construcción de un operón productor de etanol (operón *pet*) para la expresión de los genes *pdh* y *adhB* de *Zymomonas mobilis* en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Amplificación de los genes *pdh* y *adhB* de *Zymomonas mobilis*.
2. Diseño y construcción de un operón artificial con los genes *pdh* y *adhB* de *Zymomonas mobilis*.
3. Transformación de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 con operón *pet*.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 MATERIALES

#### 4.1.1 Reactivos

De Epicentre Biotechnologies, Madison, Wi, E.E.U.U. se obtuvo: El sistema MasterPure DNA Purification Kit.

De Winkler Ltda, Santiago Chile se obtuvo: Agarosa, ampicilina, bisulfito de sodio, buffer TAE 50X, glicerol y glucosa.

De Omega Bio-Tek Inc., Doroville, GA, E.E.U.U. se obtuvo: El sistema E.Z.N.A TM Plasmid Mini Kit II.

De Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, E.E.U.U se obtuvo: Agar bacteriológico, extracto de levadura, peptona y medios de cultivo.

De Invitrogen Co., Carlsbad, CA, E.E.U. se obtuvo: La enzima de restricción *EcoRI* y la enzima *Taq* DNA polimerasa.

De Integrated DNA Technologies Inc, Coralville, Iowa, E.E.U.U se obtuvo: Oligonucléotidos empleados como partidores.

De Fermentas Inc., Hanover, MD, E.E.U.U. se obtuvo: DNA ligasa de fago T<sub>4</sub>.

De Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, E.E.U.U. se obtuvo: Los sistemas de clonamiento Strataclone PCR Cloning Kit y Strataclone Blunt PCR Cloning Kit.

De Favorgen Biotech Corp., Nong-Ke, Rd, Taiwan se obtuvo: El sistema FavorPrep Gel/PCR Purification mini Kit.

De Kapa Biosystems Inc., Woburn, MA, E.E.U.U. se obtuvo: La enzima Kapa Hifi polimerasa.  
De Promega Corporation, Madison, WI, E.E.U.U. se obtuvo: X-Gal.

#### **4.1.2 Cepas bacterianas**

Las cepas utilizadas en este trabajo se resumen en la **Tabla 2**.

#### **4.1.3 Plasmidios**

Los plasmidios utilizados en este trabajo se resumen en la **Tabla 3**.

#### **4.1.4 Partidores**

En la **Tabla 4** se detallan los partidores utilizados en los experimentos de PCR.

#### **4.1.5 Equipos**

Los Equipos utilizados en este trabajo se resumen en la **Tabla 5**.

**Tabla 2.** Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

<b>Cepas</b>	<b>Fuente</b>
<i>Zymomonas mobilis</i> CDBB-B-603	CINVESTAV IPN México
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Colección CIB UDP
Células competentes SoloPack <i>E. coli</i>	Stratagene

**Tabla 3.** Plasmidios utilizados en este trabajo

<b>Plasmidio</b>	<b>Característica</b>	<b>Referencia</b>
pSC-A	4,3 kb amp <sup>r</sup> /kan <sup>r</sup> ori ColE1/ori f1 Lac Z' lox P	Stratagene
pSC-B	4,3 kb amp <sup>r</sup> /kan <sup>r</sup> ori ColE1/ori f1 Lac Z' lox P	Stratagene
pBAD-33	5,3 kb Cm <sup>r</sup> ori p15A araC	Guzman y cols, 1995
pPD-A	pSC-A con fragmento de 1707 pb, correspondiente al gen <i>pdc</i>	Este trabajo
pAD-A	pSC-A con fragmento de 1152 pb, correspondiente al gen <i>adhB</i>	Este trabajo
pProm-28	pSC-A con fragmento de 160 pb, correspondiente a la secuencia promotora	Este trabajo
pPD-B	pSC-B con fragmento de 1740 pb, que contiene la secuencia <i>pdc-adp</i>	Este trabajo
pAD-B	pSC-B con fragmento de 1247 pb, que contiene la secuencia <i>adp2-adhB-term</i>	Este trabajo
pPDAD-B	pSC-B con fragmento de 2954 pb, que contiene la secuencia <i>pdc-adp-adhB-term</i>	Este trabajo
pCL27-B	pSC-B con fragmento de 2954 pb, que contiene los genes <i>pdc-adp</i> y <i>adhB-term</i> .	Este trabajo

**Tabla 4.** Secuencia de los partidores utilizados en este trabajo.

<b>Partidor</b>	<b>Secuencia</b>
pdcl	5' ATGAGTTATACTGTCGGTACCT 3'
pdc2	5' CTAGAGGAGCTTGTTAACAGGCT 3
adh1	5' ATGGCTTCTTCAACTTTTTATATTCCCT 3'
adh2	5' TTAGAAAGCGCTCAGGAAGA GT 3'
PromA	5'TCTCAGTTTGATCAGGATTCCATCGATTTCGAACTTCTCGATTTCGAACTTC TGATAGACTTCGAAAAAAAA 3'
PromB	5'TGATAAACAAAATTTTAATTATACAACAACACACTTAGATGTCAATTTT TTTCGAAGTCTATCAGAAGT 3'
PromC	5'AGGTACCGACAGTATAACTCATATGTATATCTCCTTCTTACTTAAAGTTA AACAAAATTTTAATTATACAAC 3'
Prom1	5' TCTCAGTTTGATCAGGATTCCA 3'
Prom2	5' AGGTACCGACAGTATAACTCAT 3'
pdc2-adp	5'CTAGAGGAGCTTGTTAACAGGCTATAGAAGTTATGTCTACAACATCACA CTAATTA 3'
adp2-adh1	5'TAATTAGTGTGATGTTGTAGACATAACTTCTATAAGGAGATATACATAT GGCTTCTTCAACTTTTTATATTCCCT 3'
adh2-term	5'CGGCGGAAAGGAAAAGGAGGCCAGCGGCCTCCTTTTTTCGTTCCGT TTAGAAAGCGCTCAGGAAGA GT 3'

**Tabla 4.** Secuencia de los partidores utilizados en este trabajo. Continuación

<b>Partidor</b>	<b>Secuencia</b>
SD- <i>pdcl</i>	5'AGTAAGGCTAGCTAGTGGAGGAATCATATGAGTTATACTGCTGGTACCT 3'
M13f	5'TGTA AACGACGGCCAGT 3'
M13r	5' AACAGCTATGAC CAT G 3'
adp	5'ATGTCTACAACATCACACTAATTA 3'
term	5'CGGCGGAAAGGAAAAGGAGGCCCA 3'

**Tabla 5 .**Equipos utilizados en este trabajo.

<b>Equipo</b>	<b>Fabricante y modelo</b>
Agitador	Lab Tech LSL3016A
Cámara de electroforesis	Lab-Tec EPS-300 IIV
Cámara Fotográfica	Canon PC1311
Centrífuga	Eppendorf 5804R
Electroporador	Eppendorf Electroporator 2510
Espectrofotómetro	Shimadzu UV-150-OZ
Termociclador	Labnet LA-TC9600-G-230
Transiluminador	Harland 3-3123CE

## **4.2 MÉTODOS**

### **4.2.1 Cultivo bacteriano**

#### **4.2.1.1 Cultivo de *Zymomonas mobilis***

Las células bacterianas se cultivaron en medio líquido CDBB2 (extracto de levadura 3,0 g/L, glucosa 20 g/L, peptona 10 g/L) en una estufa a 30°C, sin agitación durante 48 hrs.

#### **4.2.1.2 Cultivo de células transformadas**

Las células transformadas con el vector de clonamiento pSC-A/pSC-B se cultivaron en placas con medio LB selectivo (Agar 1,5%, Ampicilina 0,1 g/L, LB 15,5 g/L, X-Gal 40 mg/L) a 37° durante toda la noche. El cultivo en medio líquido, se realizó en 5 mL de medio LB-Amp (LB 15,5 g/L, Ampicilina 0,1 g/L) durante toda la noche a 37°C con agitación orbital a 200 rpm.

#### **4.2.1.3 Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1**

Las células bacterianas se cultivaron en placas que contenía 20 mL de agar LB (Agar 1,5 %, LB 15,5 g/L) a 37 °C o en tubos de caldo LB (LB 15,5 g/L) durante toda la noche a 37° con agitación orbital a 200 rpm.

Las células *P. aeruginosa* recombinantes, se cultivaron en medio LB selectivo (Agar 1,5%, Cloranfenicol 50 mg/L, LB 15,5 g/L) en agitación orbital 200 rpm a 37°C. El cultivo en medio líquido se realizó en 5 mL de medio LB-Cm (LB 15,5 g/L, Cloranfenicol 50 mg/L) en las mismas condiciones que el cultivo en placa.

## 4.2.2. Amplificación de los genes *pdc* y *adhB* de *Z. mobilis*

### 4.2.2.1 Purificación de DNA genómico de *Z. mobilis*

La extracción de DNA genómico de *Z. mobilis* se realizó a partir de 5 ml de cultivo bacteriano en las condiciones señaladas en 4.2.1.1, utilizando el sistema comercial MastePure DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para evaluar la calidad de la extracción se realizó electroforesis en gel de agarosa (Agarosa 1%, TAE 0,5 %) durante 60 minutos a voltaje constante de 50 V.

### 4.2.2.2 PCR

Para la amplificación de los genes *pdc* y *adhB* de *Z. mobilis* se diseñaron partidores que flanquean los extremos de la mínima región codificante de ambos genes, *pdc1* y *pdc2* para el gen *pdc* y *adh1* y *adh2* para el gen *adhB*, como se muestra en la **Tabla 4**.

Usando el DNA genómico de *Z. mobilis* como templado se generaron los productos de PCR del gen *pdc* y *adhB* según el siguiente protocolo:

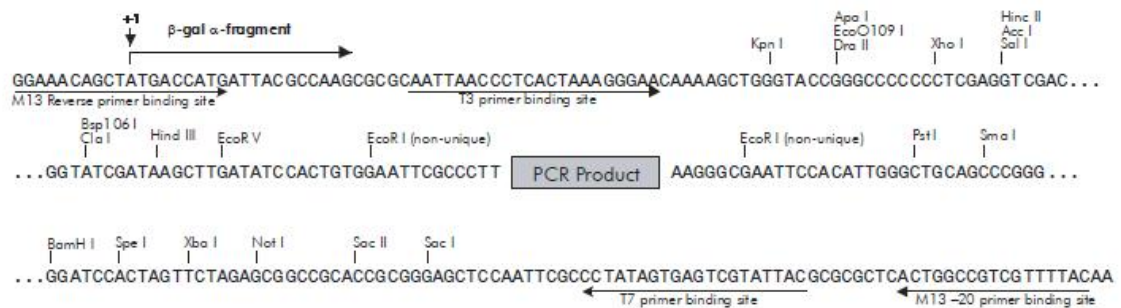
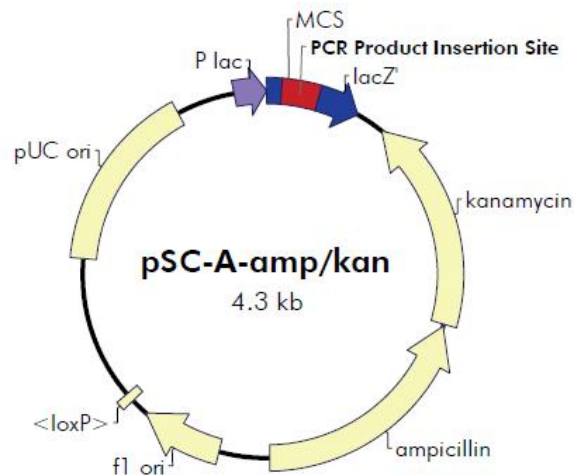
#### Mezcla:

C inicial	1x (µL)	C final
DNA genómico	5	
Amortiguador Taq (10x)	5	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2	1mM
Partidor F ( <i>pdc1/adh1</i> ) 25 µM	1	0,5 µM
Partidor R ( <i>pdc2/adh2</i> ) 25 µM	1	0,5 µM
dNTPs (10 mM c/u)	1	0,2 µM
H <sub>2</sub> O	34,5	
Taq (0,5 U)	0,5	
<b>Final</b>	<b>50</b>	

#### Protocolo de amplificación:

94°C	5 min	} 30 ciclos
94°C	1 min	
55°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	
4°C	∞	

Los productos de PCR generados se analizaron y purificaron por electroforesis en gel de agarosa (agarosa 1%, TAE 0,5%). La purificación de DNA se realizó a partir de una banda del gel de agarosa utilizando FavorPrep Gel/PCR Purification mini Kit (Favorgen Biotech Corp.), según especificaciones del fabricante. Los productos purificados se clonaron dentro de un vector Strataclone pSC-A (Figura 6).



**Figura 6. Mapa del vector de clonamiento Strataclone pSC-A-amp/kan**

#### 4.2.2.3 Análisis de clones recombinantes

Para el análisis de clones recombinantes, se analizaron colonias blancas y celestes. Estas colonias se crecieron en 5 mL de medio LB-amp y se analizaron mediante la técnica “One-Step” para “screening” de plasmidios recombinantes por tamaño (Beuken y cols, 1998), donde 150 µL



de cultivo se centrifugaron durante 15-20 s a 11000x g. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se adicionaron 40 µL de colorante de carga (azul de bromofenol 0,1 %, sacarosa 6%) y 14 µL de una mezcla de fenol:cloroformo 1:1, seguido de cortos periodos de mezcla por vortex (5-10 segundos) para lisar las células. A continuación las muestras se centrifugaron por 3 minutos para separar la fase acuosa de la fase orgánica. Finalmente 10 µL de la fase acuosa (superior) se cargó directamente en un gel de agarosa 1% junto con una muestra del vector como referencia.

A los clones que tenían el producto de interés se les extrajo DNA plasmidial utilizando el sistema comercial E.Z.N.A. plasmid mini kit II (OMEGA), según indicaciones del fabricante. Para evaluar la calidad de la extracción se realizó electroforesis en gel de agarosa (Agarosa 1%, TAE 0,5%) durante 60 minutos a voltaje constante de 50 V.

Finalmente el ADN plasmidial extraído se analizó mediante restricción con la enzima *EcoRI* y PCR utilizando la pareja de partidores *pdcl/pdc2* para el gen *pdcl* y *adh1/adh2* para el gen *adhB*.

### **4.2.3 Construcción del operón artificial**

El primer diseño del operón artificial incluyó los siguientes elementos en tandem: un promotor constitutivo fuerte, sitio de unión a ribosoma de secuencia consenso (RBS), gen *pdcl*, RBS, gen *adhB* y un terminador transcripcional para *P. aeruginosa*.

#### **4.2.3.1 Construcción del promotor**

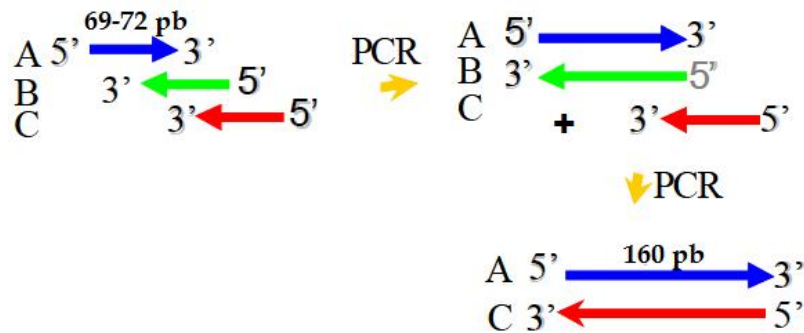
La secuencia del promotor constitutivo fuerte se obtuvo utilizando la técnica de PCR recursivo descrita por **Prodromou y Pearl, 1992**. A partir de 3 iniciadores de 69-72 nucleótidos denominados promA, promB y PromC (**Tabla 4**) se construyó una secuencia de 160 pb (secuencia que incluye el promotor, un sitio de unión a ribosoma e inicio del gen *pdcl*), según el siguiente protocolo:

<b>Mezcla:</b>		
<b>C inicial</b>	<b>1x (μL)</b>	<b>C final</b>
PromA (100 μM)	1	
PromB (100 μM)	1	
PromC (100 μM)	1	
Amortiguador Taq (10x)	5	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2	1mM
dNTPs (10 mM c/u)	1	0,2 μM
H <sub>2</sub> O	38,5	
Taq (0,5 U)	0,5	
<b>Final</b>	<b>50</b>	

**Protocolo de amplificación:**

94°C	10 min	}	20 ciclos
94°C	1 min		
60°C	1 min		
72°C	1 min		
72°C	10 min		
4°C	∞		

En esta técnica cada partidor sirve de templado de aquel oligo con el que se aparea (**Figura 7**). El fragmento resultante de 160 pb se analizó y purificó por electroforesis en gel de agarosa (agarosa 1%, TAE 0,5%). La purificación de DNA se realizó a partir de una banda del gel de agarosa utilizando FavorPrep GEL/PCR Purification mini Kit (favorgen Biotech Corp.), según especificaciones del fabricante. El producto purificado se clonó dentro de un vector Strataclone pSC-A (**Figura 7**). Los clones recombinantes se analizaron según lo descrito en 4.2.2.3 y aquellos plasmidios que contienen el promotor se analizaron mediante restricción con la enzima *EcoRI* y PCR utilizando la pareja de partidores prom1 y prom2 (**Tabla 4**).



**Figura 7. Representación del PCR recursivo.** En la misma reacción se adiciona los tres iniciadores (denominados promA, B y C), en una primera reacción de PCR, promA aparea con promB y se amplifican. En una segunda reacción de PCR, promA-B ya podrá aparear con C y se amplificará la secuencia completa (Adaptado de Romero ,2003).

#### 4.2.3.2 Construcción del fragmento promotor-RBS-*pdc*-adp

Para continuar con la construcción del operón artificial el siguiente paso es ensamblar una construcción que contenga el promotor, un sitio de unión a ribosoma, el gen *pdc* y una secuencia adaptadora de de 33 pb. Para la construcción de esta secuencia se realizó la amplificación de pPD-A (Tabla 3) utilizando varias parejas de partidores. Para la amplificación de promotor-RBS-*pdc*-adp se utilizó la secuencia promotora como partidor directo y el oligonucleótido *pdc2*-adp (Tabla 4) como partidor reverso, además se realizaron controles con las siguientes parejas de partidores: promotor/*pdc2* (promotor-*pdc*), *pdc1*/*pdc2*-adp (*pdc*-adaptador) y *pdc1*/*pdc2* (*pdc*).

Para estas reacciones se utilizó el siguiente protocolo:

##### Mezcla:

C inicial	1x (μL)	C final
DNA plasmidial	2	
Amortiguador Taq (10x)	5	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2	1mM
Partidor F (promotor/ <i>pdc1</i> )	1	
Partidor R ( <i>pdc2</i> -adp/ <i>pdc2</i> )	1	
dNTPs (10 mM c/u)	1	0,2 μM
H <sub>2</sub> O	37,5	
Taq (0,5 U)	0,5	
<b>Final</b>	<b>50</b>	

### Protocolo de amplificación:

95°C	5 min	} 30 ciclos
98°C	1 min	
55°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

#### 4.2.3.2.1 Ligación del promotor con el gen *pdC*

Como estrategia alternativa a la fusión del promotor con el gen *pdC* y la secuencia adaptadora mediante PCR se procedió a ligar la región promotora con el gen *pdC* en un volumen total de 20  $\mu$ L (2  $\mu$ L de amortiguador 10x, 5  $\mu$ L del promotor, 5  $\mu$ L del gen *pdC*, 2  $\mu$ L de PEG 4000 (polietilen glicol 4000), 5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y 1  $\mu$ L de ligasa T4 (1,5 U)) y se incubó a 12°C durante 16 horas. Se clonaron 2  $\mu$ L del producto de ligación dentro de un vector pSC-B (Figura 8), según las recomendaciones del fabricante.

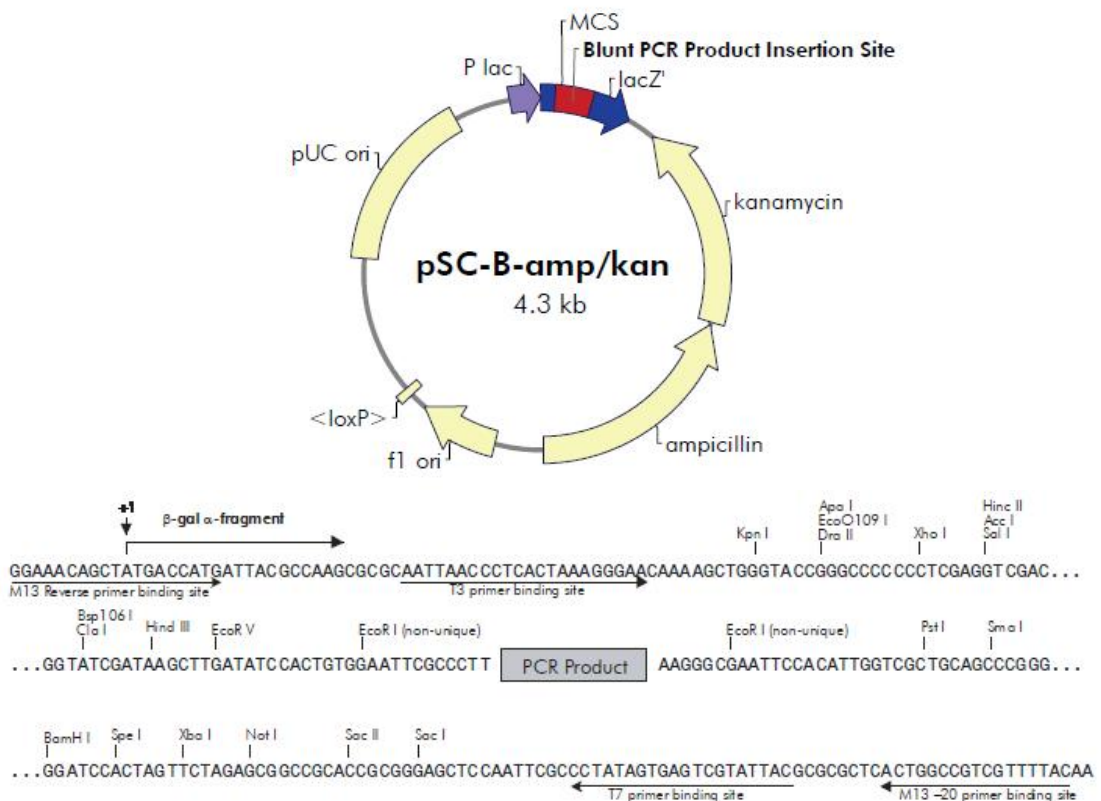


Figura 8. Mapa del vector de Clonación Strataclone Blunt pSC-B-amp/Kan

#### 4.2.3.3 Construcción del fragmento *pdc*-adaptador

El fragmento *pdc*-adaptador se construyó mediante PCR utilizando la pareja de partidores *pdc1* y *pdc2-adp* (**Tabla 4**) utilizando el plasmidio pPD-A como templado (**Tabla 3**) como se esquematiza en la **Figura 9**, según el siguiente protocolo:

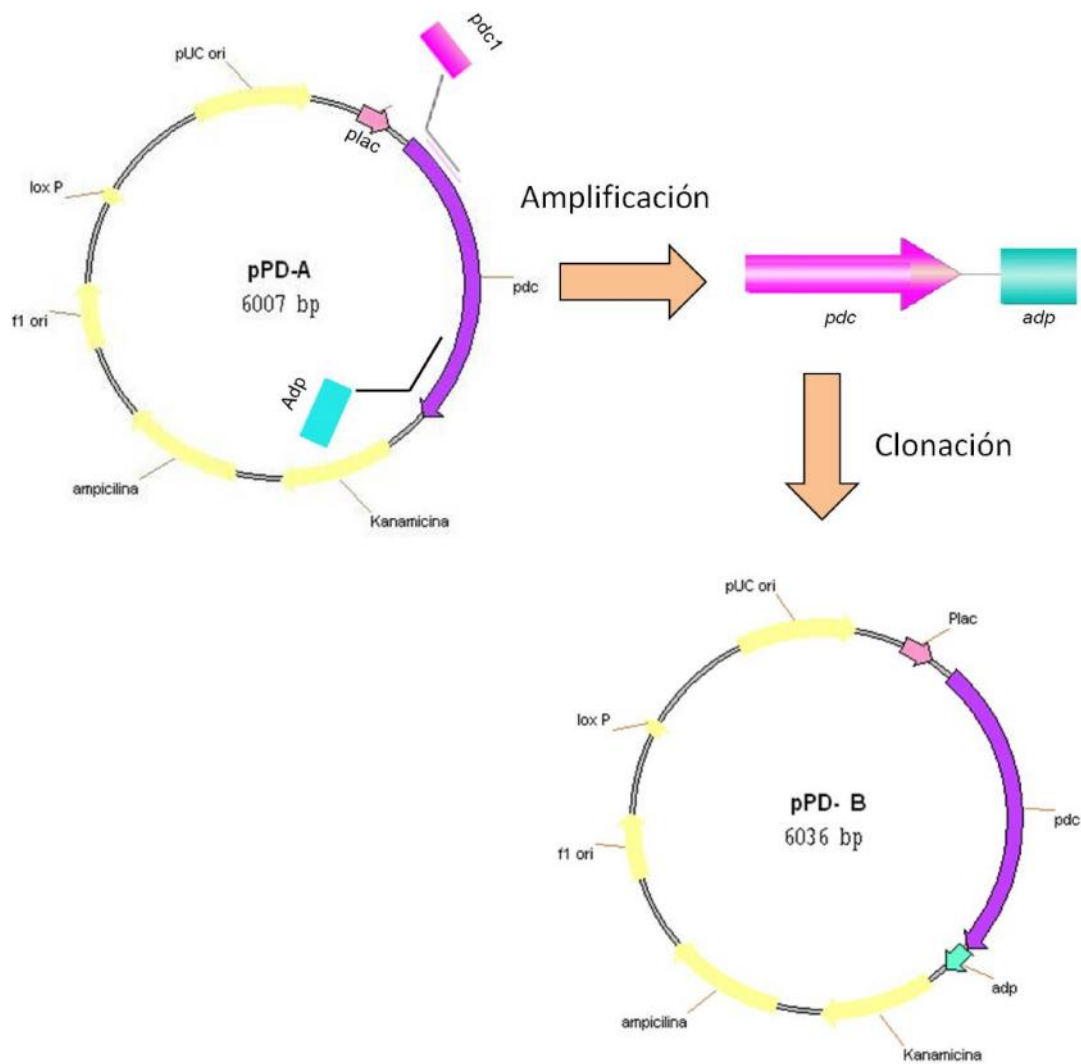
##### Mezcla:

C inicial	1x (µL)	C final
DNA plasmidial	2	
Amortiguador Kapa (5x)	10	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2	1mM
Partidor F ( <i>pdc1</i> ) 25 µM	1	0,5 µM
Partidor R ( <i>pdc2-adp</i> ) 25 µM	1	0,5 µM
dNTPs (10 mM c/u)	1	0,2 µM
H <sub>2</sub> O	32	
KAPA Hifi (1U)	1	
<b>Final</b>	<b>50</b>	

##### Protocolo de amplificación:

95°C	5 min	} 30 ciclos
98°C	1 min	
55°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

El fragmento resultante se analizó y purificó por electroforesis en gel de agarosa (agarosa 1%, TAE 0,5%). La purificación de DNA se realizó a partir de una banda del gel de agarosa utilizando FavorPrep GEL/PCR Purifacation mini Kit (favorgen Biotech Corp.), según especificaciones del fabricante. El producto purificado se clonó dentro de un vector Strataclone pSC-B (**Figura 8**). Los clones recombinantes se analizaron según lo descrito en 4.2.2.3 y aquellos plasmidios que contienen la construcción se analizaron mediante PCR utilizando la pareja de partidores *pdc1* y *pdc2* (**Tabla 4**).



**Figura 9. Esquema de la construcción del fragmento *pdc-adp*.** La construcción se realizó mediante amplificación con los partidores *pdc1/ pdc2-adp*, utilizando el plasmidio pPD-A como templado. El fragmento resultante fue clonado en el vector pSC-B utilizando el sistema comercial Strataclone PCR cloning.

#### 4.2.3.4 Construcción de fragmento *adp2-adhB-term*

El fragmento *adp2-adhB-term* se construyó mediante PCR utilizando la pareja de partidores *adp2-adh1* y *adh2-term* (Tabla 4), utilizando el plasmidio pAD-A como templado (Tabla 3), como se esquematiza en Figura 10, según el siguiente protocolo:

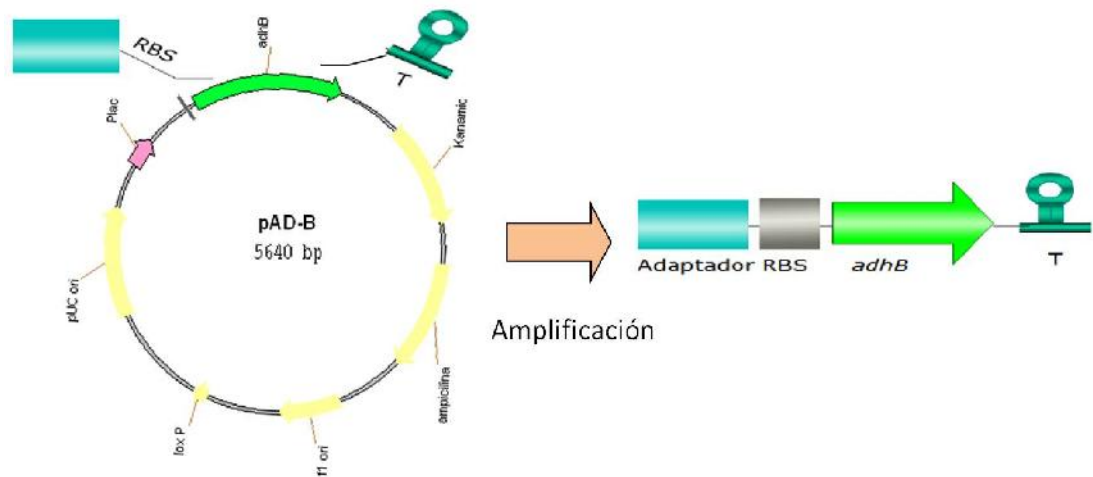
##### Mezcla:

C inicial	1x (µL)	C final
DNA plasmidial	2	
Amortiguador Kapa (5x)	10	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2	1mM
Partidor F ( <i>adp2-adh1</i> ) 25 µM	1	0,5 µM
Partidor R ( <i>adh2-term</i> ) 25 µM	1	0,5 µM
dNTPs (10 mM c/u)	1	0,2 µM
H <sub>2</sub> O	32	
KAPA Hifi (1U)	1	
<b>Final</b>	<b>50</b>	

##### Protocolo de amplificación:

95°C	5 min	} 30 ciclos
98°C	1 min	
55°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

El fragmento resultante se analizó y purificó por electroforesis en gel de agarosa (agarosa 1%, TAE 0,5%). La purificación de DNA se realizó a partir de una banda del gel de agarosa utilizando FavorPrep GEL/PCR Purifacation mini Kit (favorgen Biotech Corp.), según especificaciones del fabricante.



**Figura 10. Esquema de la construcción del fragmento *adp-adhB-term*, mediante amplificación del plasmidio pAD-B utilizando como partidor el oligonucleótido *pdcl* y el fragmento de 1247 pb *adp-adhB-term*.**

#### 4.2.3.5 Construcción del fragmento *pdC-RBS-adhB-term*

##### 4.2.3.5.1 PCR

La fusión de los fragmentos de DNA que contienen los genes *pdC* y *adhB* se realizó mediante PCR utilizando como partidor directo *pdcl* y el fragmento *adp2-adhB-term* como partidor reverso (**Tabla 4**) utilizando el plasmidio pAD-B como templado (**Tabla 3**), como se esquematiza en la **Figura 11**, o utilizando como partidor directo el fragmento de 1740 pb *pdC-adp* y como partidor reverso el oligonucleótido *adp2-term* (**Tabla 4**), utilizando el plasmidio pAD-B como templado (**Tabla 3**). Para la optimización de las condiciones de la reacción se buscaron las concentraciones adecuadas de MgCl<sub>2</sub> (0,5 mM - 2 mM) y temperatura de “annealing” (55-65°C). En ambas reacciones ambas se utilizó el siguiente protocolo:



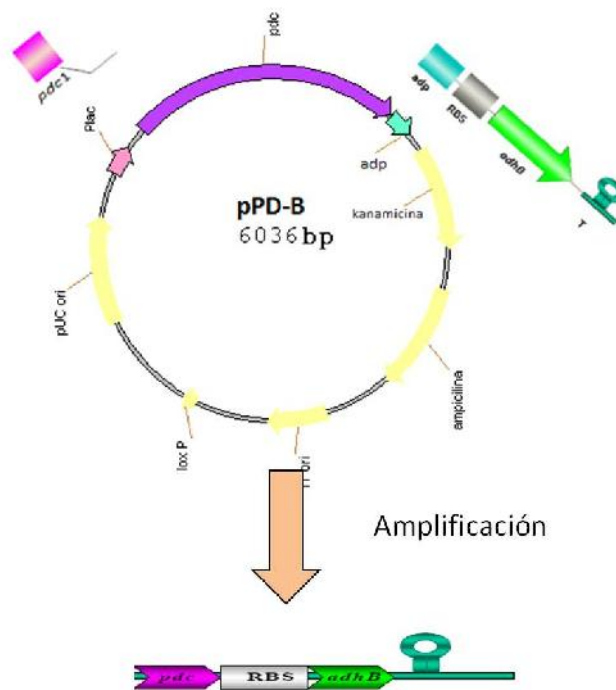
**Mezcla:**

<b>C inicial</b>	<b>1x (μL)</b>	<b>C final</b>
DNA plasmidial	2	
Amortiguador Kapa (5x)	10	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1-4	0,5-2 mM
Partidor F ( <i>adp1/pdc-adp</i> )	1	
Partidor R ( <i>adp2-adhB-term</i> ) / term)	1	
dNTPs (10 mM c/u)	1	0,2 μM
H <sub>2</sub> O	32,5-30	
KAPA Hifi (1U)	1	
<b>Final</b>	<b>50</b>	

**Protocolo de amplificación:**

95°C	5 min	} 30 ciclos
98°C	1 min	
55-65°C	1 min	
72°C	3 min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

Los productos resultantes se analizaron y purificaron por electroforesis en gel de agarosa (agarosa 1%, TAE 0,5%). La purificación de DNA de la banda se realizó a partir de una banda del gel de agarosa que contenía un producto del tamaño cercano al esperado utilizando FavorPrep GEL/PCR Purification mini Kit (favorgen Biotech Corp.), según especificaciones del fabricante. El producto purificado se clonó dentro de un vector Strataclone pSC-B (**Figura 8**).



**Figura 11. Construcción del fragmento *pdc*-RBS-*adhB*-term**, mediante la amplificación del plasmidio pPD-B utilizando como partidor directo el oligonucleótido *pdc1* y el fragmento de 1247 pb *adp-adhB*-term

#### 4.2.3.5.2 Ligación de los fragmentos *pdc*-*adp* y *adp*-*adhB*-term

De manera alternativa a la fusión de las construcciones *pdc*-*adp* y *adp*-*adhB*-term mediante PCR se procedió a ligar ambas construcciones en un volumen total de 20  $\mu$ L [2  $\mu$ L de amortiguador 10x, 5  $\mu$ L del fragmento *pdc*-*adp*, 5  $\mu$ L del fragmento *adp*-*adhB*-term, 2  $\mu$ L de PEG 4000 (polietilen glicol 4000), 5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y 1  $\mu$ L de ligasa T4 (1,5 U)] y se incubó a 12°C durante 16 horas. Se clonaron 2  $\mu$ L del producto de la ligación dentro de un vector Strataclone pSC-B (**Figura 8**). Los clones recombinantes se analizaron según lo descrito en 4.2.2.3. Aquellos plasmidios que contienen la construcción se analizaron mediante PCR utilizando la pareja de partidores *pdc1/pdc2*, *adh1/adh2* y *pdc1/term*. El plasmidio pCL27-B se analizó conjuntamente con las parejas de partidores M13r/*pdc2*, M13r/*term* y *pdc1/M13f*.

#### 4.2.4 Análisis de secuencia de DNA

Las construcciones realizadas se secuenciaron empleando el método de Sanger en la empresa GenYtec utilizando los oligonucleótidos M13 reverse y M13 forward. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante la herramienta Bioinformática BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

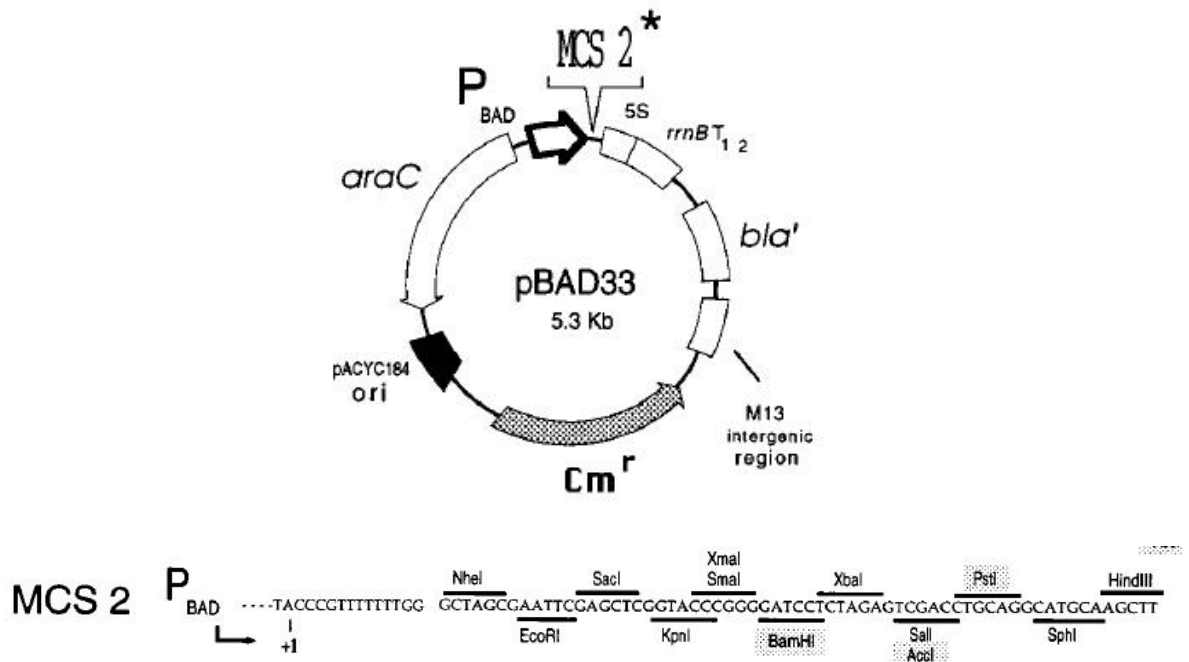
#### 4.2.5 Determinación de la estabilidad del vector de expresión pBAD-33 en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Debido a que la estrategia de utilizar un promotor constitutivo fuerte no fue posible se decidió dejar los genes *pdC* y *adhB* de la ruta etanolérgica de *Zymomonas mobilis*, bajo la regulación del promotor inducible del operón arabinosa. Para esto es necesario probar la compatibilidad del origen de replicación del plasmidio pBAD-33 (**Figura 12**) en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

##### 4.2.5.1 Preparación de células electrocompetentes de *P. aeruginosa* PAO1

Las células electrocompetentes se prepararon a partir de un cultivo de crecimiento exponencial. Para ello se inoculó 100 mL de medio LB con 1 mL de un cultivo crecido hasta fase estacionaria. Las células se colectaron a una OD<sub>600</sub> de 0,6 en tubos de centrifuga fríos y se centrifugó durante 10 minutos a 2000 x g. El precipitado bacteriano obtenido se resuspendió en 40 mL de glicerol 10% frío y se centrifugó durante 10 minutos a 2000 x g. Este procedimiento se repitió dos veces.

Después de los lavados, las células se resuspendieron en el glicerol 10% remanente del tubo después de la última centrifugación. Se midió el volumen de la suspensión celular y se determinó la OD<sub>600</sub> diluyendo una pequeña porción de ella en glicerol 10%. Se ajustó el volumen del precipitado celular para llegar a una OD<sub>600</sub> final 200-250 mL. Las células se alicuotaron y se usaron directamente para la electroporación o se almacenaron a -80°C.



**Figura 12. Mapa del vector de expresión pBAD33.** Sitio MCS 2\* = MCS2 + dobles sitios adicionales para EcoRI y NheI (Guzman y cols, 1995).

#### 4.2.5.2 Transformación por electroporación

Se utilizó un equipo Eppendorf modelo Electroporator 2510 acoplado a un controlador de pulso, para realizar la transformación de las células competentes. Las condiciones de electroporación fueron las siguientes: 2.500 V, 200 y 25  $\mu$ F de capacitancia. Para la transformación se mezclaron 40  $\mu$ L de células electrocompetentes con 1-2  $\mu$ L de DNA plasmidial en un tubo y se electroporó la mezcla en una cubeta de electroporación (previamente enfriada a -20°C) de 0,2 cm de separación entre los electrodos.

Posteriormente las células se resuspendieron en 1 mL de medio LB estéril y se incubó a 37°C durante 1 h. Las células transformadas se sembraron en placas de agar LB selectivo y se incubaron durante 24 h a 37°C

#### 4.2.5.3 Análisis de células transformadas

Las células de *P. aeruginosa* PAO1 transformadas con el vector pBAD33 se crecieron en 5 mL de medio LB-Cm y se analizaron utilizando técnica “One-Step” según lo descrito en 4.2.2.3.

#### 4.2.6 Placas indicadoras de aldehídos

Para verificar la expresión del operón *pet*, las células *Pseudomonas* transformadas se crecieron en placas indicadoras de aldehídos, estas placas permiten la detección directa de aquellos clones que producen la enzima alcohol deshidrogenasa.

Las placas indicadoras se prepararon adicionando 8 mL de parosnilina (2,5 mg/mL de etanol 95%) y 100 mg de bisulfito de sodio para de 400 mL de agar LB.

El etanol difunde en las células y puede ser convertido a acetaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa, generando un producto rojo que difunde alrededor del agar (**Conway y cols, 1987b**).

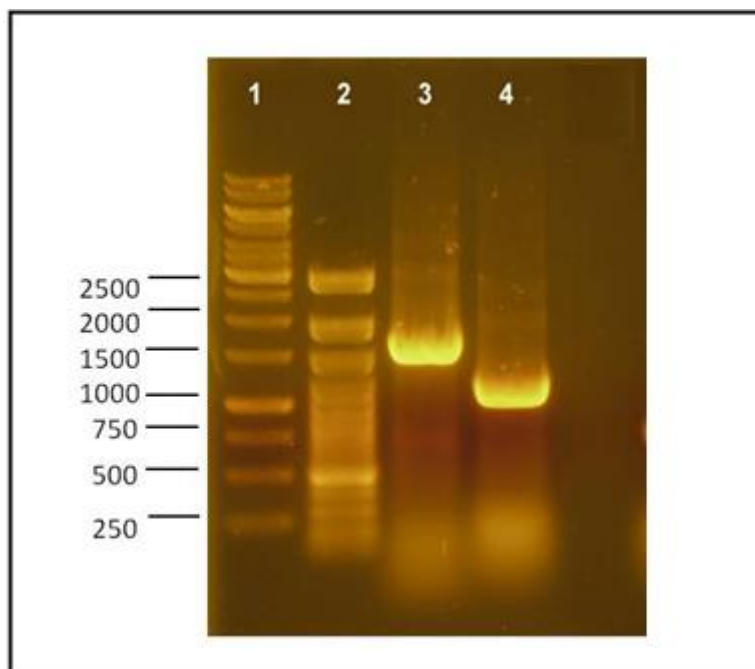
Para los ensayos empleando transformantes de *E. coli* con los plasmidios pPD-A, pAD-B y pCL27-B se adicionó además IPTG a una concentración final de 100 mM.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Amplificación de genes *pdc* y *adhB* a partir de DNA genómico de *Z. mobilis*

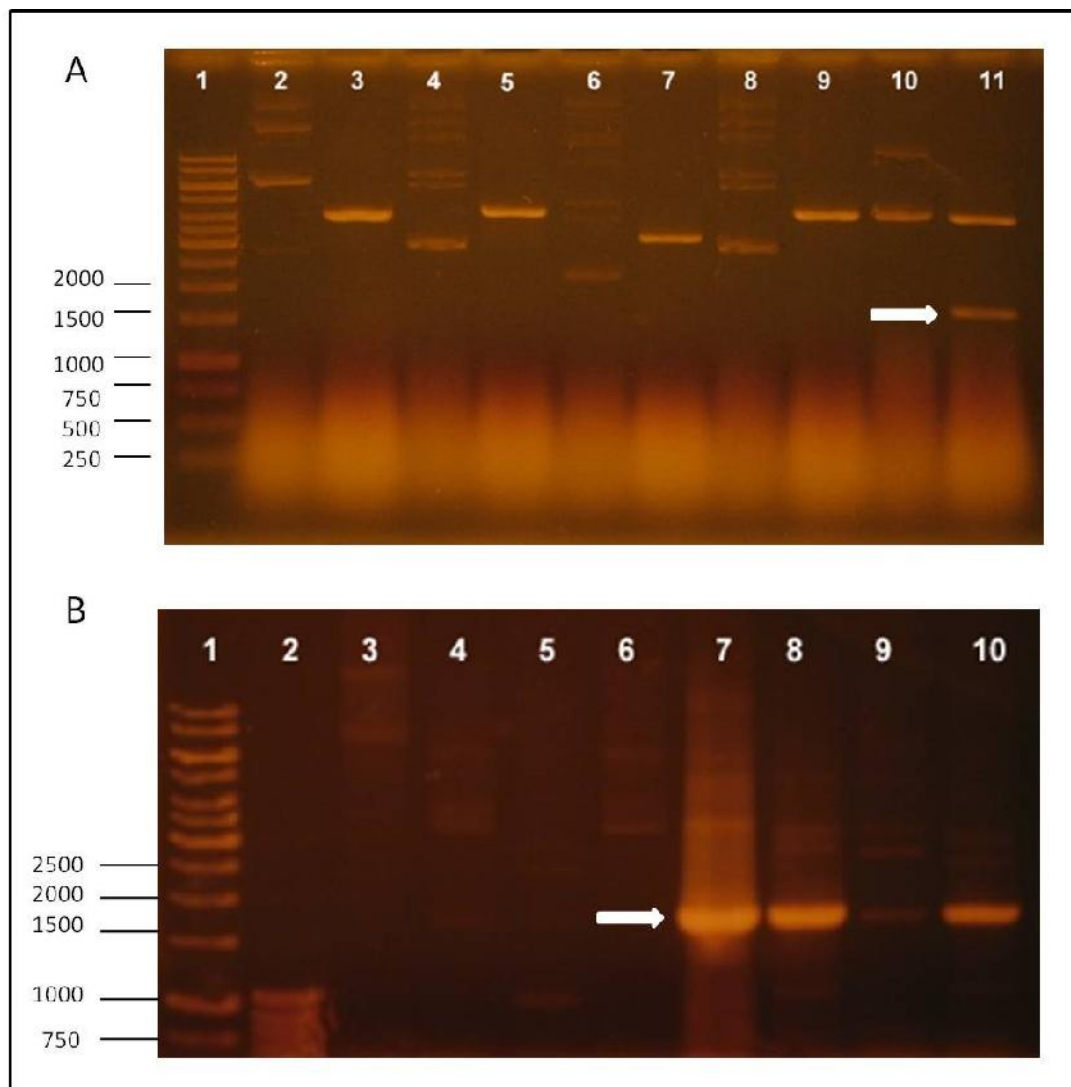
En *Z. mobilis* la producción de etanol depende de dos enzimas, piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa. En esta bacteria existen dos isoformas para ADH, ADHI (*adhA*) y ADHII (*adhB*), siendo ADHII la mayor contribuyente de la actividad deshidrogenasa de la célula y posee un alto grado de especificidad para etanol como sustrato (Kinoshita y cols, 1985; Neale y cols, 1986), por esta razón se utilizó en este trabajo la segunda isoforma de esta enzima.

Para la amplificación de los genes *pdc* y *adhB* se utilizaron la pareja de partidores *pdc1/pdc2* y *adh1/adh2* respectivamente (Tabla 4). Los productos de PCR obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Para el gen *pdc* se obtuvo un amplicón de aproximadamente 1700 pb como lo muestra la Figura 13, carril 3 y para el gen *adhB* se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1100 pb (Figura 13, carril 4). Ambos fragmentos amplificados coinciden con los tamaños teóricos esperados de 1707 pb y 1152 pb para los genes *pdc* y *adhB* respectivamente.

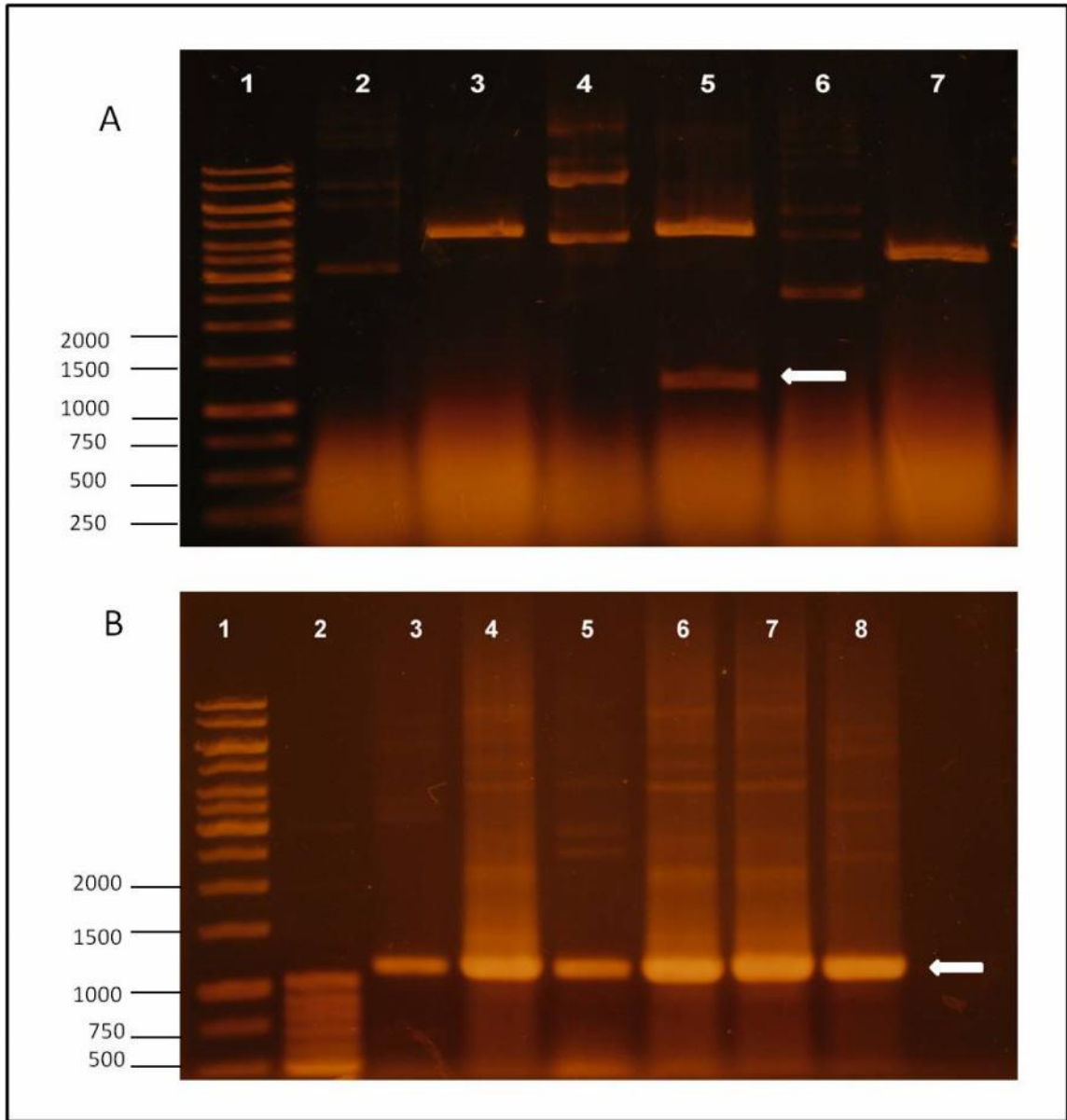


**Figura 13. Separación electroforética de los productos de amplificación de los genes *pdc* (carril 3) y *adhB* (carril 4).** Los carriles 1 y 2 corresponden a los estándares de peso molecular 1 Kb y 100 bp (Fermentas) respectivamente.

Las bandas con los productos de PCR de interés se extrajeron del gel de agarosa y se purificaron como se describe en el punto 4.2.2.2 de materiales y métodos. Posteriormente estos fragmentos de DNA purificados se clonaron en el vector pSC-A (**Figura 6**). El DNA plasmidial de las colonias obtenidas mediante ensayos de restricción con la enzima *EcoRI* (**Figuras 14 A y 15 A**), mediante PCR (**Figuras 14 B y 15 B**) y secuenciación (**Figuras 16 y 17**). De todas las transformantes blancas analizadas, solo una bacteria contenía el plasmidio recombinante pPD-A (pSC-A + gen *pdc*) y dos colonias contenían el plasmidio recombinante pAD-A (pSC-A + gen *adhB*).

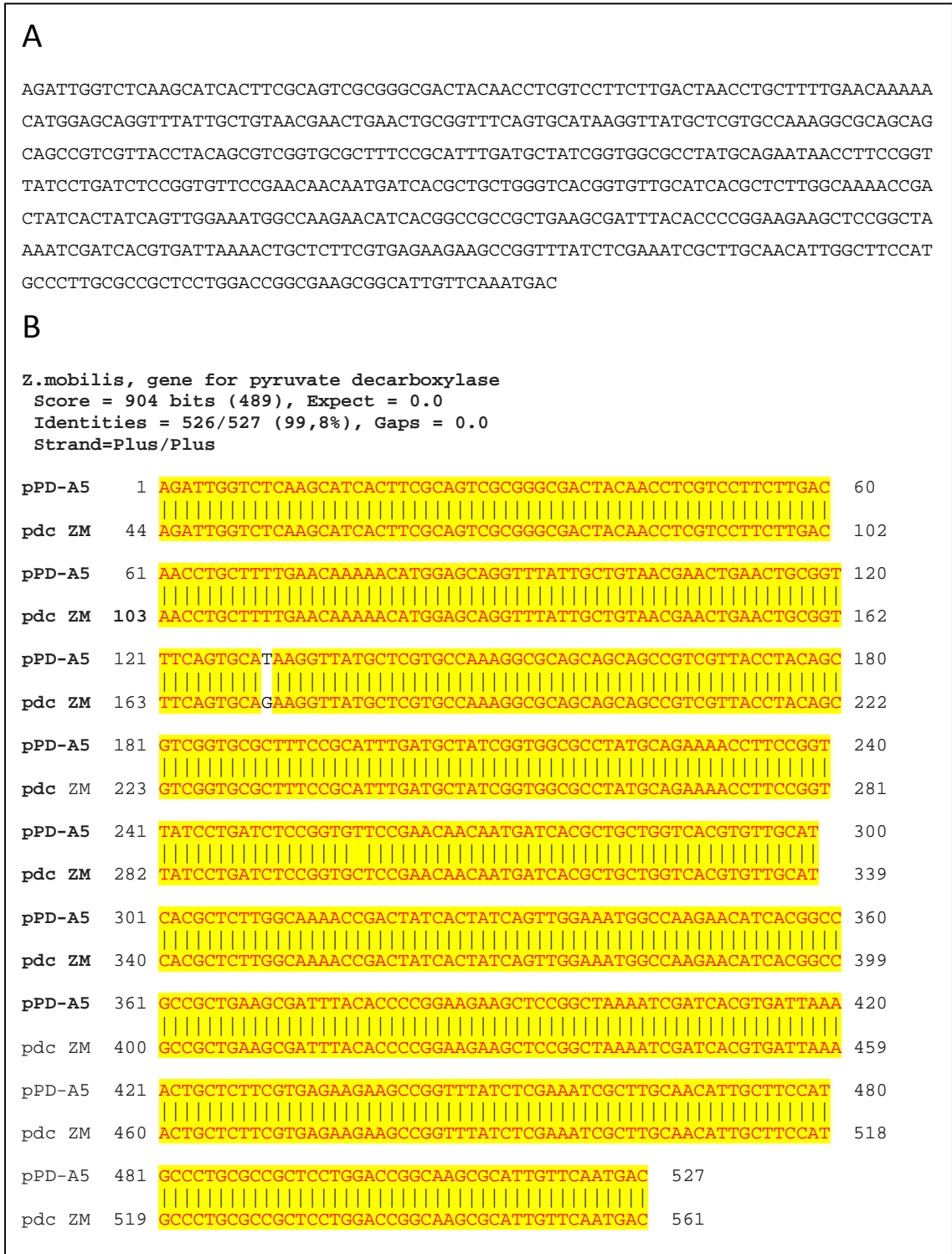


**Figura 14. Análisis de clones transformados con pPD-A.** A, Gel Agarosa 1%. Carriles 3,5, 7, 9, 11 muestran la digestión con la enzima *EcoRI* de los plasmidios extraídos de las bacterias transformadas con pPD-A. La flecha indica el fragmento esperado de 1707 pb correspondiente al gen *pdc* (carril 11). B, Gel Agarosa 1%. Carril 1, estándar de peso molecular 1 Kb (Fermentas). Carriles 3-9 muestran el resultado de la amplificación de los plasmidios extraídos de las células transformadas con pPD-A. La flecha señala los amplicones resultantes (carriles 7,8 y 9) coinciden con el tamaño del gen *pdc* cargado como control (carril 10).

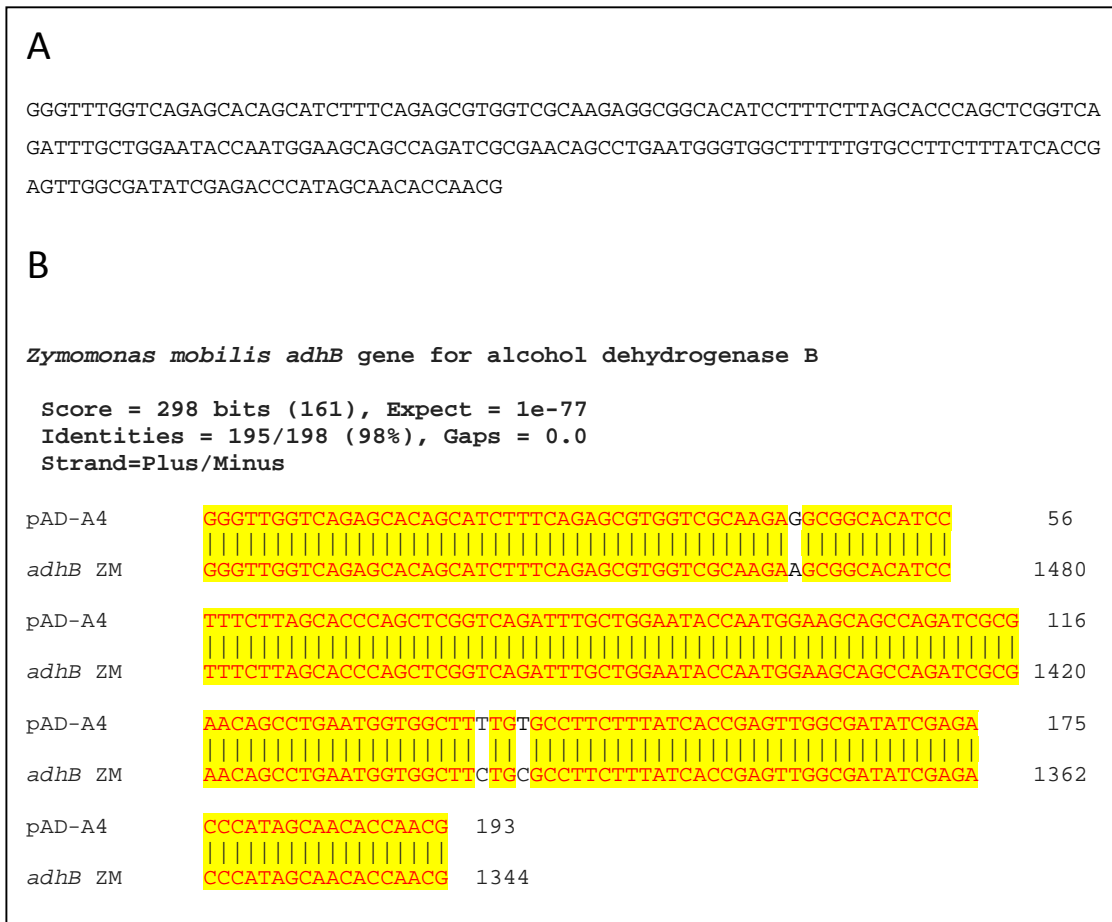


**Figura 15. Análisis de clones transformados con pAD-A.** A, Gel Agarosa 1%., Carril 1, estándar de tamaño molecular 1 Kb (Fermentas). Carriles 3,5,7 muestran la digestión con la enzima *EcoRI* de los plasmidios extraídos de las células transformadas con pAD-A. La flecha señala el fragmento esperado de 1152 pb (carril 5) correspondiente al gen *adhB*.  
 B, Gel Agarosa 1%. Carril 1, estándar de tamaño molecular 1 Kb (Fermentas). La flecha señala el resultado de la amplificación de los plasmidios extraídos de las células transformadas con pAD-A (carriles 3-7). Los amplicones resultantes coinciden con el tamaño del gen *adhB* cargado como control en el carril 8.





**Figura 16. Secuencia y análisis del gen *pdC* de *Z. mobilis* CDBB-B- 603. A, Secuencia de la región 3' del gen *pdC*. B, BLASTn de la secuencia del gen *pdC*. La secuencia obtenida muestra una identidad del 99.8% con el gen de la enzima piruvato descarboxilasa de *Z. mobilis* ATCC 10988 (GenBank: CP002850.1).**



**Figura 17. Secuencia y análisis del gen *adhB* de *Z. mobilis* CDBB-B-603.** A, Secuencia de la región 3' del gen *adhB*. B, BLASTn de la secuencia del gen *adhB*. La secuencia obtenida muestra una identidad del 98% con el gen de la enzima alcohol deshidrogenasa II de *Z. mobilis* ATCC 10988 (GenBank: CP002850.1).

## 5.2 Diseño y construcción de un operón artificial con los genes *pdC* y *adhB* de *Z. mobilis*

### 5.2.1 Diseño de operón productor de etanol (operón *pet*)

El diseño del operón artificial incluyó los siguientes elementos en tándem: promotor consenso, sitio de unión a ribosoma (RBS), gen *pdC*, RBS, gen *adhB* y un terminador transcripcional para *P. aeruginosa* (**Figura 18**).

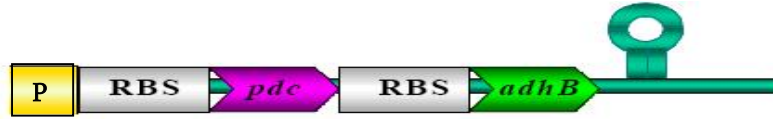


Figura 18. Diseño del operón etanológico para *P. aeruginosa* PAO1 (Adaptado de Romero, 2003).

### 5.2.2 Construcción de operón *pet*

Para la construcción del operón productor de etanol se desarrolló el siguiente esquema de reacciones:

- Diseño y construcción de un promotor consenso.
- Amplificación del gen *pdC* de *Z. mobilis* con la secuencia promotora-RBS en la región 5' y una secuencia adaptadora de 33 pb en la región 3' (promotor-RBS-*pdC*-adp).
- Amplificación del gen *adhB* de *Z. mobilis* con una secuencia adaptadora-2 de 47 pb (secuencia complementaria a la región adaptadora y que contiene un sitio de unión a ribosoma) en la región 5' y un terminador transcripcional en la región 3' (adp2-*adhB*-term).
- Solapamiento de productos de PCR por complementariedad de las construcciones promotor-RBS-*pdC*-adp y adp2-*adhB*-term para obtener el operón completo (promotor-RBS-*pdC*-RBS-*adhB*-term).

#### 5.2.2.1 Diseño y Construcción del promotor para el operón artificial.

Para la regulación del operón artificial se diseñó como promotor, un promotor consenso que contiene la región -35 (TTGACA), la caja -10 (TATAAT). Adicionalmente el promotor precede un sitio de unión al ribosoma (AAGGAG) y contiene un fragmento de 22 pb del gen *pdC*. (Figura 19).

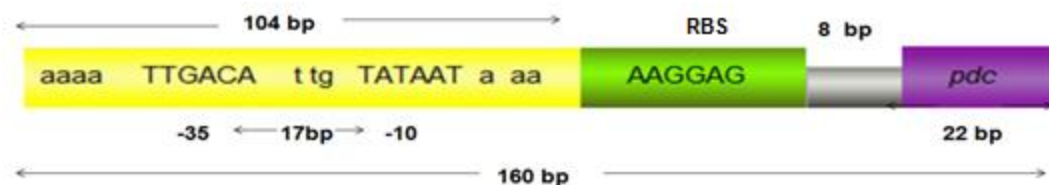
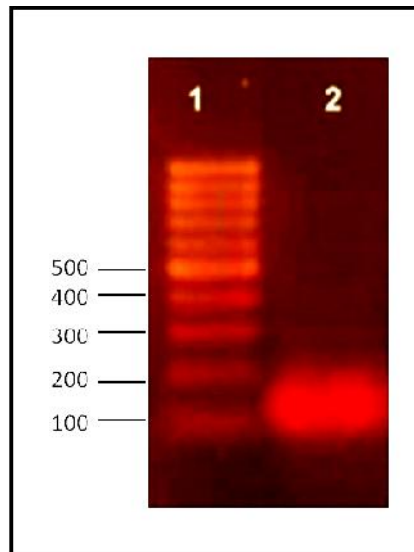


Figura 19. Esquema del promotor diseñado. Se señalan las bases consenso en la secuencia del promotor (104 pb), seguido un sitio de unión a ribosoma (RBS), separado a 8 pb del sitio de inicio del gen *pdC* (22pb).

La secuencia del promotor se obtuvo utilizando la técnica de PCR recursiva (**Figura 7**). A partir de tres partidores de 69-72 nucleótidos, promA, promB y promC (**Tabla 4**), como se describe en 4.2.3.1. El resultado de este PCR recursivo se muestra en la **Figura 29, carril 2** donde se aprecia la obtención de un fragmento de aproximadamente 160 bp.

El producto del PCR recursivo de 160 pb que contiene la región 5' del promotor se clonó en el plasmidio pSC-A (**Figura 6**). La construcción correcta se confirmó mediante análisis de restricción con la enzima *EcoRI*, aquellos clones positivos se analizaron mediante PCR utilizando partidores que flanquean los extremos de promotor (prom1/prom2), obteniéndose dos candidatos para secuenciación, secuencias denominadas prom27 y prom28. Los resultados de la secuenciación mostraron que sólo la secuencia prom28 coincide con el diseño teórico realizado (**Figura 21**).



**Figura 20. Producto del PCR recursivo.** Gel de agarosa 3%. Carril 1 marcador de tamaño molecular 100bp (Fermentas), en el carril 2 se observa el resultado de la reacción de PCR recursivo.

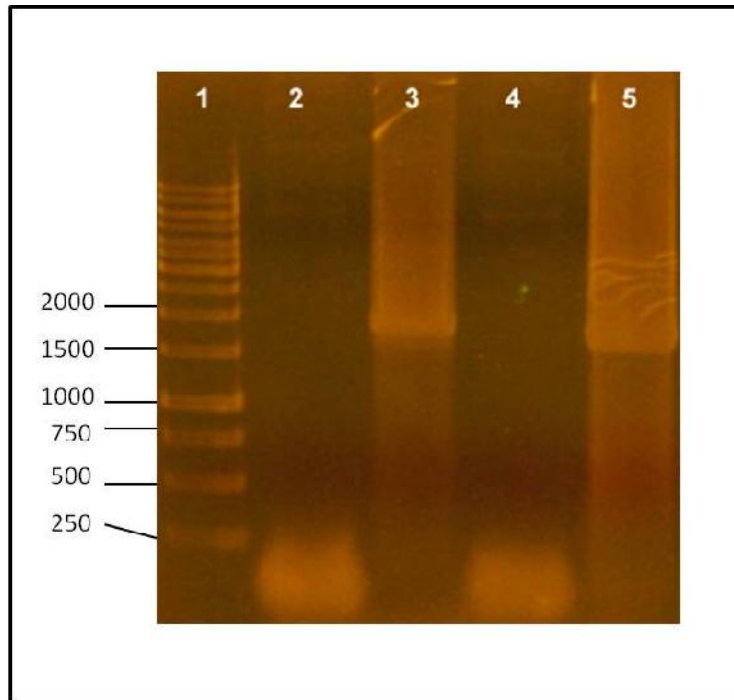
ATCGACGAGATTCTGTAGACTATCCAACCGCGAATTGAATTCCCGCGGTGCGGCCAACTA  
 GAACTAGTGGATTTCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTT**TCTCAGTTTGATC**  
**AGGATTCCATCGATTTCGAACTTCTCGATTTCGAACTTCTGATAGACTTCGAAAAAAATTGA**  
**CATCTAAGTGTGTTGTGTATAAT**TAAAAATTTGTTAATTTAAGTAAG**AAGGAGATATA**  
**CATATGAGTTATACTGTCGGTACCT**AAGGGCGAATTCCACAGTGGATATCAAGCTTATCG  
 ATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTA  
 ATTGCGCGCTTGGCGTAATTCCTTTTTTTTAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT  
 CACAATTCACACAACATACGAGCCGGGAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATG  
 AGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCT  
 GTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGG  
 GCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGC  
 GG

**Figura 21. Secuenciación de prom28.** La secuencia promotora se muestra en amarillo. Las cajas -35 y -10 y el sitio de unión a ribosoma se muestran en celeste.

### 5.2.2.2 Amplificación promotor-RBS-*pdc*-adp

Para la amplificación del fragmento promotor-RBS-*pdc*-adp se utilizó la secuencia promotora-RBS como partidor directo y el oligonucleótido *pdc2*-adp (**Tabla 4**) como partidor reverso, utilizando el plasmidio pPD-A como templado. Además se realizaron controles con las siguientes parejas de partidores: promotor/*pdc2* (producto de amplificación promotor-RBS-*pdc*), *pdcl*/*pdc2*-adp (producto de amplificación *pdcl*-adaptador) y *pdcl*/*pdc2* (producto de amplificación secuencia del gen *pdcl*). Los resultados de estas reacciones se muestran en la **Figura 22**.

De todas las parejas de partidores analizados solo dieron como producto aquellas reacciones de amplificación en las que se utilizaron las parejas promotor-RBS/*pdc2* y *pdcl*/*pdc2*. El producto de la reacción utilizando la secuencia promotora-RBS y el oligonucleótido *pdc2*, resulta en la unión de la secuencia promotora-RBS con el gen *pdcl*, producto de aproximadamente 1800 pb (**Figura 21, carril 3**). La banda que contiene este producto se cortó, purificó y posteriormente se clonó en el vector pSC-A. Se analizó el DNA plasmidial de 20 clones obtenidos mediante análisis de restricción con la enzima *EcoRI* y amplificación con los partidores prom1/*pdcl* (**Tabla 4**). Ninguno de los 20 clones analizados resultó positivo para la amplificación del segmento promotor-RBS-*pdcl*.



**Figura 22. Amplificación de la secuencia promotor-RBS-*pdc*-adp.** En la figura se muestra el resultado de la amplificación de pPD-A utilizando 4 combinaciones de partidores: promotor-RBS/*pdc2*-adp (carril 2), promotor-RBS/ *pdc2* (carril 3), *pdcl*/*pdc2*-adp (carril 4) y *pdcl*/*pdc2* (carril 5), utilizado como control positivo. El carril 1 corresponde al estándar de tamaño molecular de 1 Kb (Fermentas).

### 5.2.2.3 Ligación promotor-*pdc*

Como manera alternativa a la amplificación de la construcción promotor-RBS-*pdc*-adp, se prosiguió a ligar la región promotora-RBS con el gen *pdc* utilizando T4 ligasa según lo descrito en 4.2.3.2.1 de materiales y métodos. El producto de ligación se clonó en un vector pSC-B (**Figura 8**), no obteniéndose ninguna colonia transformante que contenga el plasmidio recombinante, sugiriendo que el carácter constitutivo del promotor construido pueda ser tóxico para las células bacterianas transformadas. Debido a esta razón se decidió emplear finalmente para la construcción del operón artificial el promotor inducible por arabinosa P<sub>BAD</sub> contenido en el plasmidio pBAD 33 (**Figura 12**) que posee la secuencia:

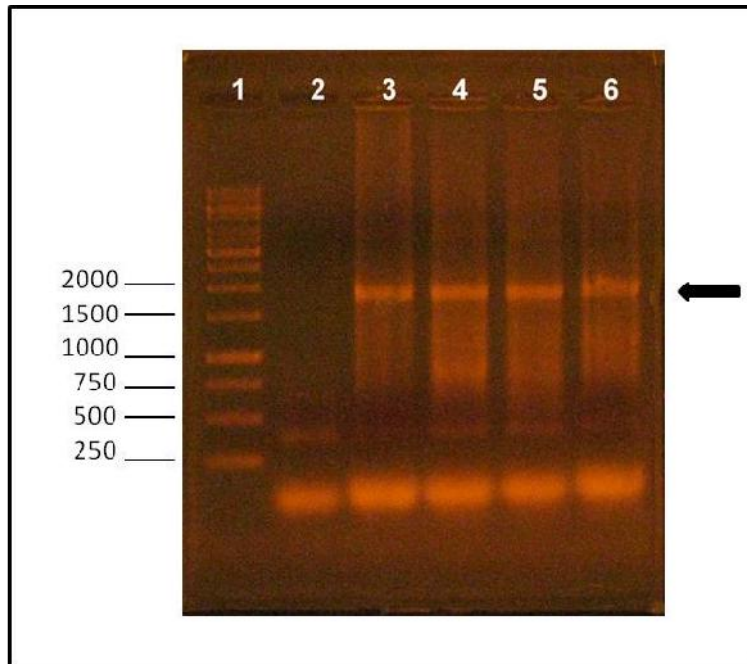
5'- GTTTCTCCATACCCGTTTTTTTTGGGCTAGC-3'

Esto llevó a replantear la estrategia para el diseño del operón artificial para la incorporación de los genes *pdc* y *adhB* de *Pseudomonas aeruginosa*, la que se programó en 5 etapas:

- Construcción del fragmento que contenga el gen *pdc* de *Z. mobilis* con un adaptador de 33 pb en la región 3' de esta construcción.
- Amplificación del gen *adhB* de *Z. mobilis* con una secuencia adaptadora-2 de 47 pb (secuencia complementaria a la región adaptadora y que contiene un sitio de unión a ribosoma) en la región 5' y un terminador transcripcional en la región 3' (*adp2-adhB-term*).
- Solapamiento de productos de PCR por complementariedad de las construcciones *pdc-adp* y *adp2-adhB-term* para la obtención de la secuencia *pdc-RBS-adhB-term*
- Adicionar la región Shine-Dalgarno río arriba del gen *pdc*
- Insertar la construcción *RBS-pdc-RBS-adhB-term* en el vector pBAD33

#### **5.2.2.4 Construcción del fragmento *pdc*-adaptador**

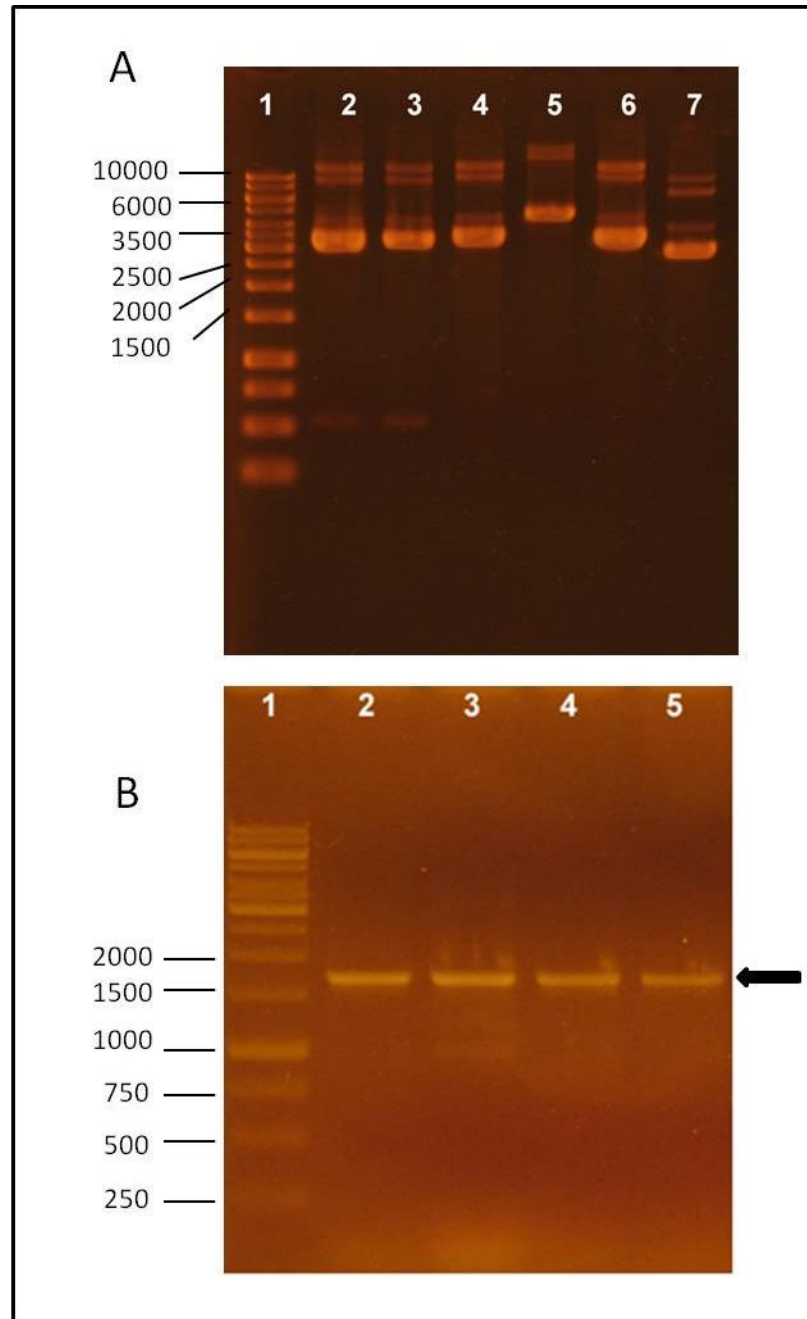
La primera etapa en la construcción del re-diseño del operón artificial consistió en la amplificación de un fragmento que contiene la mínima región codificante del gen *pdc* y una secuencia adaptadora de 33 pb. Para esto se realizó una amplificación del plasmidio pPD-A utilizando los partidores *pdc1* y *pdc2-adp* (**Tabla 4**). La reacción de PCR obtenida se sometió a análisis mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. En la **Figura 23** se muestra la amplificación de un fragmento mayor a 1707 bp (1740 pb) correspondiente al producto *pdc-adp*.



**Figura 23. Separación electroforética de los productos de amplificación *pdc-adp*.** Gel agarosa 1%, Carril 1, estándar tamaño molecular de 1 Kb (Fermentas), carril 2 control negativo, carril 3 gen *pdc*, utilizado como control positivo, la flecha indica los fragmentos de 1750 pb correspondiente al producto *pdc-adp* (carriles 4-6).

La banda con el producto de PCR de interés se extrajo del gel de agarosa y se purificó como se describe en el punto 4.2.3.3 de materiales y métodos. Posteriormente este fragmento de DNA purificado se clonó en el vector pSC-B (**Figura 8**). Las bacterias transformadas con pPD-B (pSC-B + *pdc-adp*), se analizaron mediante PCR utilizando los partidores *pdc1* y *pdc2* (**Tabla 4**) como se muestra en la **Figura 24**. Uno de estos clones se secuenció para comprobar la inserción de la secuencia adaptadora como lo muestra la **Figura 25**.





**Figura 24. Análisis de clones transformados con pD-B.** A. Separación electroforética de DNA plasmidial extraído de los clones transformados con pPD-B. B. Separación electroforética de los productos de PCR de pPD-B. Carril 1, estándar de tamaño molecular 1 Kb (Fermentas). La flecha indica las bandas de 1707 pb correspondiente al gen *pdc* de los clones transformados con pPD-B (carriles 2-4).

```

5 'GTTGAATATGAAATGCAGTGGGGTCACATTGGTTGGTCCGTTCCCTGCCGCCTTCGGTTATGCCGTC
GGTGCTCCGGAACGTCGCAACATCCTCATGGTTGGTGATGGTTCCTTCCAGCTGACGGCTCAGGAAGT
CGCTCAGATGGTTTCGCCTGAAACTGCCGGTTATCATCTTCTTGATCAATAACTATGGTTACACCATCG
AAGTTATGATCCATGATGGTCCGTACAACAACATCAAGAAGTGGGATTATGCCGGTCTGATGGAAGTG
TTCAACGGTAACGGTGGTTATGACAGCGGTGCTGGTAAAGGCCTGAAGGCTAAAACCGGTGGCGAACT
GGCAGAAGCTATCAAGGTTGCTCTGGCAAACACCGACGGCCCAACCCTGATCGAATGCTTCATCGGTC
GTGAAGACTGCACTGAAGAATTGGTCAAATGGGGTAAGCGCGTTGCTGCCGCCAACAGCCGTAAGCCT
GTTAACAAGCTCCTCTAGTAATTAGTGTGATGATGTTGTAGACATAACTTCTAT 3 '

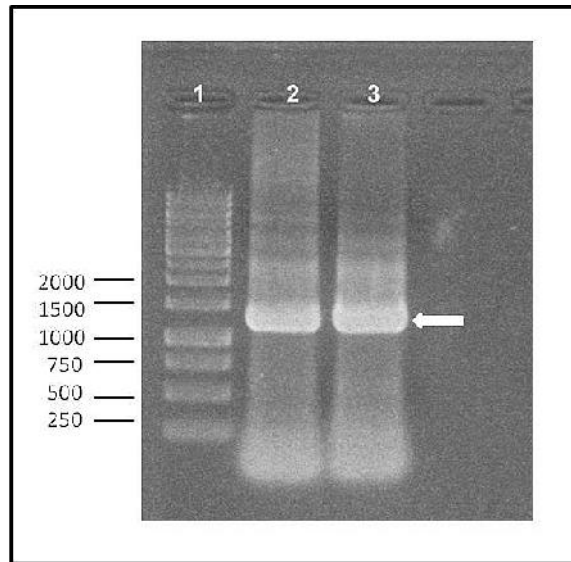
```

**Figura 25. Secuencia de la región 3' *pdc*-*adp*.** La región turquesa corresponde a la secuencia adaptadora.

### 5.2.2.5 Construcción del fragmento *adp2-adhB-term*

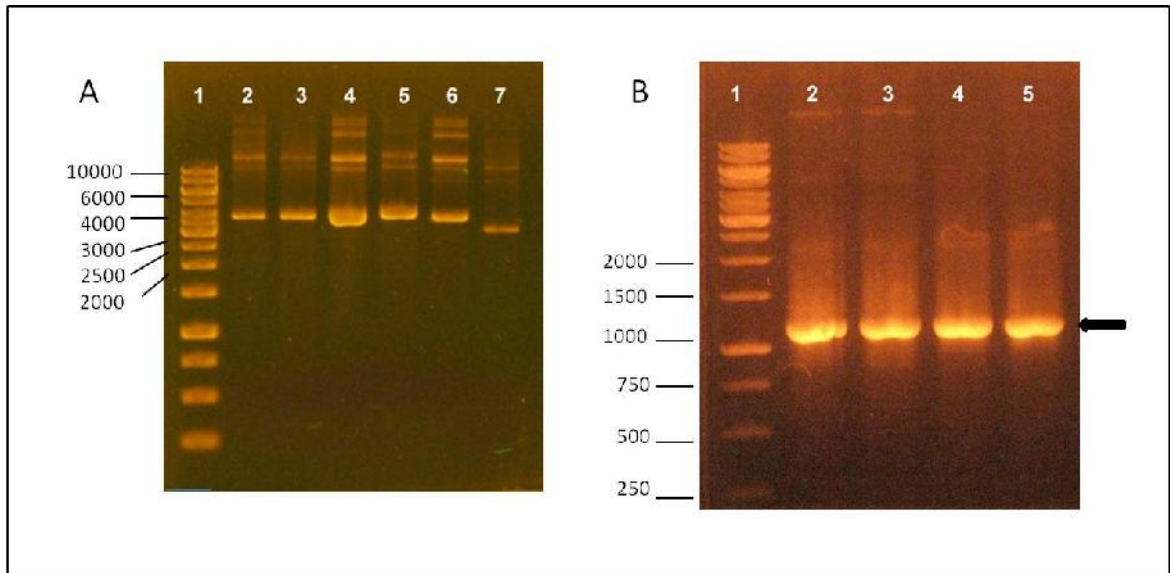
En una segunda etapa se construyó un fragmento de 1247 pb que está constituido por una región intergénica de 47 pb que contiene una zona complementaria a la región adaptadora de la construcción *pdc*-*adp* (construido en 5.2.2.4) y un sitio de unión a ribosoma denominada *adp-2*, la mínima región codificante para *adhB* y un terminador transcripcional específico para *P. aeruginosa* PAO1, cuya secuencia fue tomada de la base de datos: <http://transterm.cbcb.umd.edu/query.php>. Este fragmento se construyó mediante PCR utilizando la pareja de primarios *adp2-adh1* y *adh2-term* (**Tabla 4**), utilizando el plasmidio pAD-A como templado.

La reacción de PCR obtenida se sometió a una separación electroforética en gel de agarosa al 1% como se muestra en la **Figura 26**, obteniéndose un producto mayoritario de aproximadamente 1300 pb.



**Figura 26. Separación electroforética de los productos de PCR de pAD-A.** Carril 1 estándar de tamaño molecular de 1 Kb (Fermentas), en los carriles 2 y 3 se muestra el producto de PCR empleando los partidores *adp2-adh1* y *adh2-term*. La flecha indica los fragmentos amplificados de aproximadamente 1300 pb correspondientes a *adp-adhB-term*.

La banda con el producto de interés se extrajo del gel de agarosa y se purificó como se describe en el punto 4.2.3.4 de materiales y métodos y posteriormente este fragmento de DNA purificado se clonó en el vector pSC-B (**Figura 8**). Las bacterias transformadas con pAD-B (pSC-B + *adp2-adhB-term*), se analizaron mediante PCR utilizando los partidores *adh1* y *adh2* (**Tabla 4**) como se muestra en la **Figura 27**. Uno de estos clones se secuenció para comprobar la inserción de la secuencia adaptadora como lo muestra la **Figura 28**.



**Figura 27. Análisis de clones transformados con pAD-B.** A, Extracción de DNA plasmidial bacterias transformadas con pAD-B. B, Separación electroforética de los productos de PCR de DNA de bacterias transformadas con pAD-B empleando los partidores *adh1* y *adh2*. Carril 1, estándar 1Kb, Los amplicones de los Carril 2-5 muestran un fragmento del tamaño esperado, aproximadamente 1200 pb que corresponde con el tamaño de gen *adhB* (1152 pb), como lo indica la flecha.

### 5.2.2.6 Construcción del fragmento *pdC-adp-adhB-term*.

#### 5.2.2.6.1 PCR

Para realizar la fusión de los fragmentos de DNA que contienen los genes *pdC* y *adhB*, necesarios para la incorporación de la ruta etanológica de *Z. mobilis* en *P. aeruginosa* se realizó una reacción de PCR empleando como partidor “sense” *pdC1* (**Tabla 4**) y como partidor antisentido el fragmento *adp-adhB-term* de 1247 pb purificado, construido como se detalló en 5.2.2.5 . Como DNA templado se utilizó el plasmidio pPD-B (**Tabla 3**). La reacción de PCR empleando una temperatura de “annealing” de 60 °C produjo productos inespecíficos de tamaños superiores e inferiores al fragmento esperado de aproximadamente 3 kb (2954 pb) (**Figura 28, carril 2**). Por otra parte, en la reacción de PCR empleando una temperatura de “annealing” de 65 °C también se produjeron productos inespecíficos de tamaños superiores e inferiores al fragmento esperado de aproximadamente 3 kb (**Figura 28, carril 3**).

```

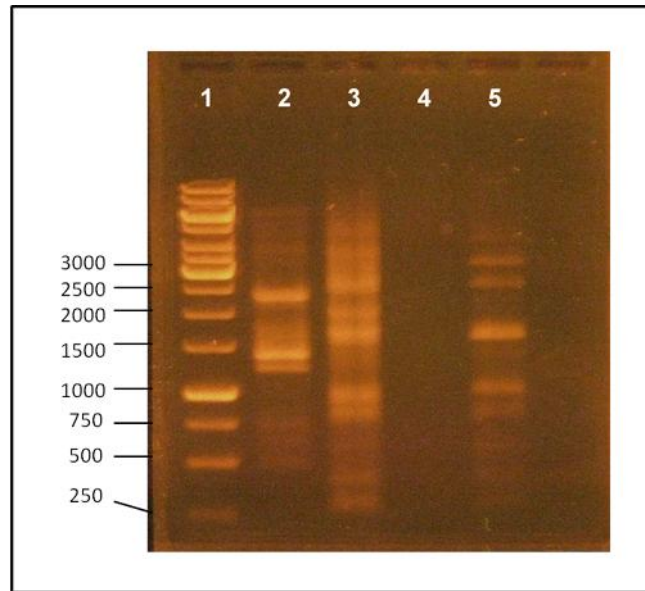
5' TAATTAGTGTGATGATGTTGTAGACATAACTTCTATAAGGAGATATACATATGGCTTCTTCAAC
TTTTTATATTCTTTTCGTCAACGAAATGGGCGAAGGTTTCGCTTGAAAAAGCAATCAAGGATCTTAA
CGGCAGCGGCTTTAAAAATGCGCTGATCGTTTCTGATGCTTTCATGAACAAAATCCGGTGTGTGAA
GCAGGTTGCTGACCTGTTGAAAGCACAGGGTATTAATTCTGCTGTTTATGATGGCGTTATGCCGAA
CCCGACTGTTACCGCAGTTCTGGAAGGCCTTAAGATCCTGAAGGATAACAATTCAGACTTCGTCAT
CTCCCTCGGTGGTGGTTCTCCCATGACTGCGCCAAAGCCATCGCTCTGGTTCGCAACCAATGGTGG
TGAAGTCAAAGACTAC 3'

```

**Figura 28. Secuencia de la región 5' y 3' del fragmento *adp2-adhB-term* clonado en pAD-B.** La región turquesa corresponde a la secuencia adaptadora, la región fucsia corresponde a la secuencia de sitio de unión a ribosoma (RBS).

Se repitieron estas reacciones aumentando y disminuyendo la temperatura de “annealing”, variando la concentración de  $Mg^{2+}$ , agregando DMSO como “enhancer” y variando parámetros del programa de PCR como tiempo de extensión, tiempo de desnaturación etc., pero en todos los casos se obtuvieron productos inespecíficos diferentes al esperado (datos no mostrados).

Alternativamente, se realizó una reacción de PCR empleando como partidor “sense” el fragmento *pdc*-*adp* de 1740 pb purificado, construido como se detalló en 5.2.2.4 y como partidor antisentido el partidor term (**Tabla 4**). Como DNA templado se utilizó el plasmidio pAD-B (**Tabla 3**). La reacción de PCR empleando estos partidores se realizó con una temperatura de “annealing” de 60 °C (**Figura 29, carril 4**) no generándose productos de amplificación y con una de temperatura de “annealing” de 65 °C (**Figura 29, carril 5**) obteniéndose menos productos inespecíficos que en los casos anteriores. En esta amplificación se observa un fragmento mayoritario de aproximadamente 1700 bp que podría corresponder al fragmento *pdc*-*adp* empleado como partidor “sense” y dos amplicones de interés, un fragmento con un tamaño superior a los 3 kb y otro inferior a los 3 kb (**Figura 29, carril 5**). Estos fragmentos al igual que el de 2,4 kb generado en la reacción del carril 2 (**Figura 29**) se aislaron, purificaron y clonaron según lo descrito en 4.2.2.5.1 de materiales y métodos. Se extrajo DNA plasmidial de 20 clones de cada una de las transformaciones y se analizaron mediante PCR empleando las combinaciones de partidores *pdc1/pdc2*, *adh1/adh2* y *pdcl/term* (**Tabla 4**). Ninguno de los clones analizados presentó la disposición esperada de construcción del fragmento *pdc*-*adp*-*adhB-term*.

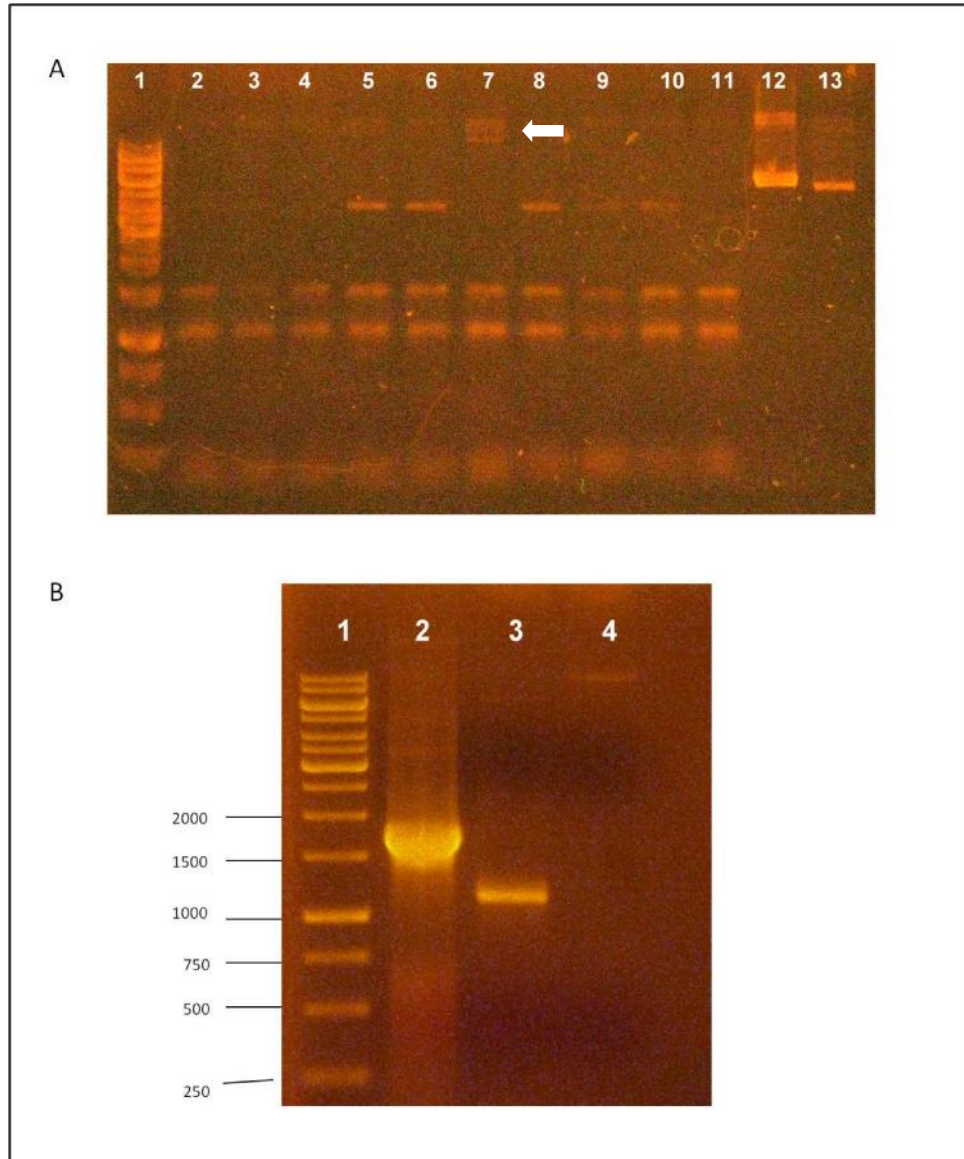


**Figura 29. Separación electroforética de productos de PCR. *pdc*-RBS-*adhB*-term.** Carril 1 estándar de 1 Kb, carril 2 y 3 amplicones obtenidos de la reacción de PCR utilizando los partidores *pdc1* y *adp2-adhB*-term a Tm 60 y 65°C respectivamente. Carril 4 y 5 amplicones obtenidos de la reacción de PCR utilizando los partidores *pdc*-*adp* y *adh1* a Tm 60 y 65°C respectivamente.

#### 5.2.2.6.2 Ligación de los fragmentos *pdc*-*adp* y *adp2-adhB*-term

Como otra alternativa, para obtener una construcción que contenga los genes *pdc* y *adhB* con las secuencias adaptadoras y de unión al ribosoma, se realizaron reacciones de ligación del fragmento *pdc*-*adp* (obtenido en 5.2.2.4) con el fragmento *adp*-*adhB*-term (obtenido en 5.2.2.5) empleando T4 DNA ligasa. Para ello se amplificó el primer fragmento a partir del plasmidio pPD-B empleando Kapa Hifi polimerasa con los partidores *pdc1* y *adp*, obteniéndose un producto de 1,7 kb. El segundo fragmento *adp*-*adhB*-term también se amplificó empleando Kapa Hifi polimerasa con los partidores *adh1* y *term* a partir del plasmidio pAD-B, obteniéndose un producto de aproximadamente 1,2 kb. Los fragmentos amplificados se aislaron y purificaron y se ligaron empleando T4 DNA ligasa como se describe en 4.2.3.5.2 de materiales y métodos. Los productos obtenidos después de la reacción de ligación se clonaron en el vector pSC-B siguiendo las indicaciones del fabricante (Stratagene). Se extrajo DNA plasmidial de 25 clones obtenidos de la transformación y posteriormente se analizaron mediante PCR empleando las combinaciones de partidores *pdc1*/*pdc2*, *adh1*/*adh2* y *pdc1*/*term*.

Se obtuvo una construcción (plasmidio pCL27-B) (**Tabla 3**) que posee los genes *pdC* y *adhB* de *Z. mobilis* (**Figura 30**). Los análisis de PCR utilizando las parejas de partidores *pdC1/pdC2* (producto de amplificación gen *pdC*), *adh1/adh2* (producto de amplificación gen *adhB*), *pdC1/term* (producto de amplificación *pdC*-RBS-*adhB*-term) (**Figura 30 B**), *M13r/pdC2* (producto de amplificación gen *pdC*), *M13r/term* (producto de amplificación *pdC*-RBS-*adhB*-term) y *pdC1/M13f* (producto de amplificación *pdC*-RBS-*adhB*-term ) (**Tabla 6**) muestran que el gen *pdC* no se encuentra en la orientación esperada (**Figura 29**), por tal motivo no fue posible obtener la construcción del fragmento *pdC*-RBS-*adhB*-term, pese a las estrategias e intentos realizados.



**Figura 30. Análisis de los clones transformados con pSC-B que contiene el producto de ligación de los fragmentos *pdc-adp* y *adp2-adhB-term*.** A, DNA total de clones transformados. Carril 1, estándar 1 Kb, carriles 2-11, muestran la extracción de DNA total de 10 clones resultantes de la transformación con pSC-B que contiene el producto de ligación. En los carriles 12 y 13 se cargó pPD-B y pAD-B como control respectivamente. La flecha en el gel señala un plasmidio de tamaño mayor a los plasmidios control, denominado pCL27-B. B, Análisis de pCL27-B mediante PCR. Carril 1, estándar 1 Kb, carril 2 amplicón de 1700 Kb correspondiente al tamaño del gen *pdc* (1707 pb), carril 3 amplicón de 1200 pb, correspondiente al tamaño del gen *adhB* (1152 pb). En el carril 4 se muestra resultado negativo para la amplificación con los partidores *pdc1/term*.



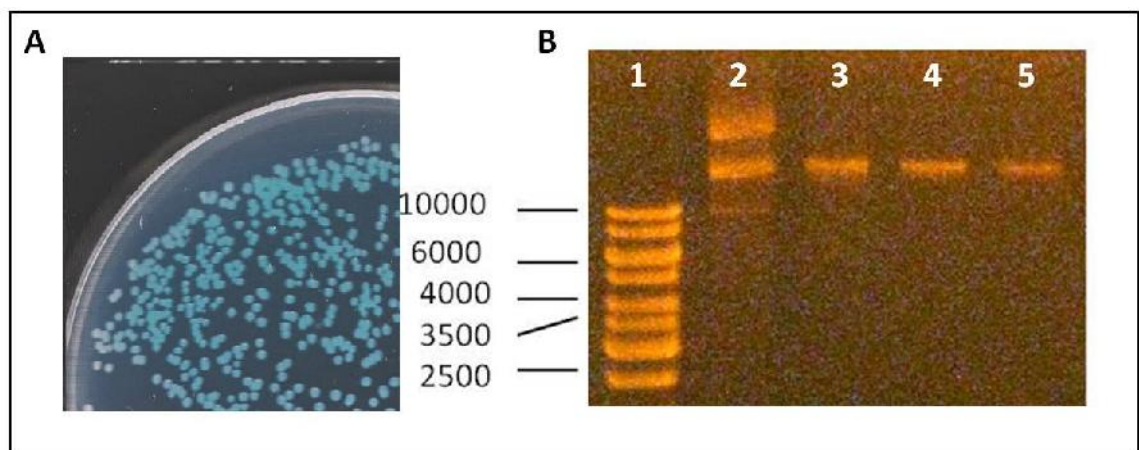
**Tabla 6.** Resultado de análisis por PCR del plasmidio pCL27-B

Partidor directo	Partidor reverso	Producto de PCR
M13r	pdc2	Ausencia de amplicón
M13r	Term	Amplicón de 3 Kb aprox
pdc1	M13f	Ausencia de amplicón

### 5.3 Transformación de la cepa receptora *P. aeruginosa* PAO1

Para determinar la estabilidad de un vector de expresión que contenga los genes *pdc* y *adhB*, necesarios para la incorporación de la ruta etanológica de *Z. mobilis* en la cepa receptora, se transformó la cepa *P. aeruginosa* PAO1 con el plasmidios pBAD33 (**Figura 12**) como se describe en 4.2.5 de materiales y métodos.

En la **Figura 31 A** se aprecia colonias de *P. aeruginosa* PAO1 transformadas con el plasmidio pBAD33. Se tomaron varios clones de esta transformación y se extrajo DNA plasmidial el cual se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% coincidiendo el patrón de migración con el del control de plasmidio pBAD33 empleado para la transformación de la cepa receptora (**Figura 31 B**).



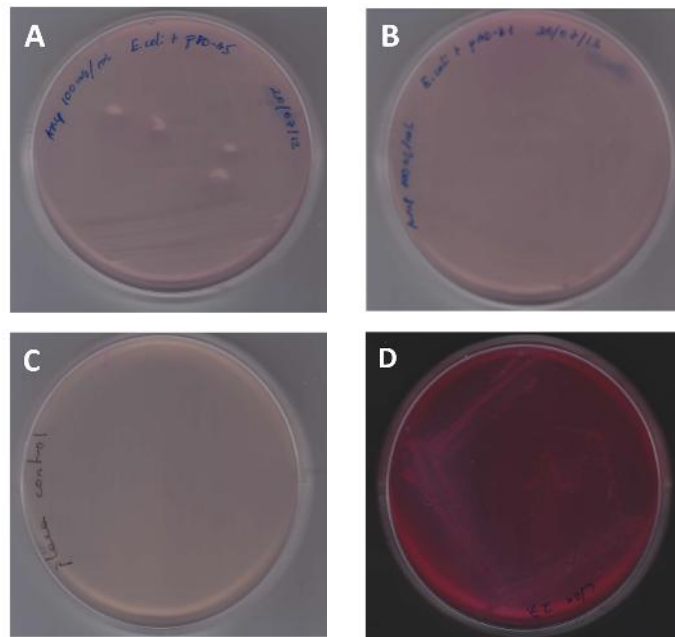
**Figura 31.** Transformación de la cepa receptora *P. aeruginosa* PAO1. A, colonias de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 que transportan el plasmidio pBAD33. B, Extracción de DNA plasmidial de colonias *Pseudomonas*, carril 1, estándar 1Kb, carril 3 pBAD33 cargado como control, carril 3-5 separación electroforética de la extracción de DNA plasmidial de tres colonias de *P. aeruginosa* PAO1

#### 5.4. Análisis fenotípico de la actividad alcohol deshidrogenasa

Para la detección de la actividad alcohol deshidrogenasa se empleó la detección directa en placas con indicador para aldehído como se describe en 4.2.6 de materiales y métodos. Esta técnica utiliza para la detección de aldehído mediante una mezcla de pararosanilina y bisulfito que se emplean para detectar aldehídos en azúcares y glicoproteína (Conway y cols, 1987b). Estos reactivos se incorporan a medio sólido de crecimiento de las bacterias y se agrega etanol como fuente de carbono. Rápidamente la presencia de la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa se detecta por la conversión del etanol a aldehído produciéndose un color rosado en el medio de cultivo el cual se extiende o difunde por la placa.

Se crecieron en placas indicadoras para actividad alcohol deshidrogenasa, cepas de *E. coli* transformada con los plasmidios pPD-A, pAD-B y pCL27-B como se muestra la **Figura 32**.

Solo la placa indicadora sembrada con *E. coli* pCL27-B presentó cambio en el color (**Figura 32 D**), lo que indica la funcionalidad de la enzima alcohol deshidrogenasa.



**Figura 32. Análisis fenotípico de la actividad alcohol deshidrogenasa mediante detección directa en placas con indicador para aldehído.** A, *E. coli* transformada con el plasmidio pPD-A. B, *E. coli* transformada con pAD-A. C, placa control. D, *E. coli* transformada con el plasmidio pCL27-B.

## 6. DISCUSIÓN

En *Z. mobilis* la productividad teórica de etanol a partir de glucosa es superior al 97%, mientras que para *S. cerevisiae* solo alcanza el 90-93%. Esto se debe a que en la ruta Entner-Doudoroff (ED) solo se genera una molécula de ATP por molécula de glucosa, asegurando un alto flujo de glucosa por esta ruta y una menor producción de biomasa, siendo más carbono canalizado para la fermentación de etanol (**Sprenger y cols, 1996**).

*Z. mobilis*, produce etanol mediante la ruta ED en conjunto con las enzimas piruvato descarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADH) (**Hoppner y Doelle, 1983; Wills y cols, 1981**). Por otra parte, *Pseudomonas aeruginosa* tiene incompleta la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas, debido a que carecen de la enzima 6-fosfofructokinasa y asimila azúcares y ácidos orgánicos preferencialmente a través de la ruta de Entner-Doudoroff, en la cual 6-fosfogluconato es un intermediario clave, generando piruvato como producto final de la ruta (**García y cols, 2003**). Dada esta características metabólica de *P. aeruginosa* es posible configurar una ruta metabólica etanológica mediante la construcción de un operón artificial que contenga las señales adecuadas para la expresión de los genes *pdh* y *adhB* de *Z. mobilis*.

Como primera etapa para la construcción de un operón artificial funcional en *P. aeruginosa* se amplificaron y clonaron los genes *pdh* y *adhB*, provenientes de la cepa de *Z. mobilis* CDBB-B-603, en el vector pSC-A generándose las construcciones pPD-A y pAD-A respectivamente (**Tabla 4**). El análisis de las secuencias de estos genes muestra que el gen *pdh* clonado poseen un 99,8% identidad y con el reportado por **Ohta, K y cols, (1991a)**, en cambio el gen *adhB* posee 98% de identidad con el descrito por **Conway y cols, (1987b)**. Esto permite confirmar que los genes *pdh* y *adhB* de la cepa de *Z. mobilis* CDBB-B-603 poseen bajo polimorfismo en relación a la cepa *Z. mobilis* descritas en la literatura.

Como siguiente paso se diseñó un operón artificial siguiendo la estructura clásica de los operones bacterianos (**Merino y cols, 2008**), presentando los siguientes elementos: en la región 5' un promotor inducible, seguido río abajo por los genes *pdh* y *adhB* con sus respectivos sitios

de unión al ribosoma y en la región 3' un terminador transcripcional específico para *P. aeruginosa* (**Figura 18**).

El promotor seleccionado originalmente para construir el operón artificial para la expresión de los genes *pdC* y *adhB* es el que se muestra en la **Figura 19**. Este promotor es un promotor consenso fuerte para expresión constitutiva y se construyó empleando la técnica de PCR recursivo (**Prodromou y Pearl, 1992**) y luego se clonó en el vector pSC-A obteniéndose la construcción pProm-28, que se secuenció como se muestra en la **Figura 20**.

Todos los intentos por empalmar el gen *pdC* proveniente de *Z. mobilis* con el promotor constitutivo construido fueron infructuosos. Una de las razones que podría explicar esta situación es el carácter constitutivo del promotor construido, lo que implica que las construcciones que portan el gen *pdC* bajo el control de la expresión de este promotor constitutivo fuerte pueden ser tóxicas para las células bacterianas transformadas, produciendo un envenenamiento. Este fenómeno de muerte celular por toxicidad se ha estudiado detalladamente para la expresión de proteínas de membrana y globulares en *E. coli*, cuando se sobreexpresan bajo el control de un promotor inducible, lo que causa la muerte o envenenamiento de la célula hospedera de la construcción (**Miroux y Walker, 1996**).

Debido a esta razón, se decidió emplear finalmente para la construcción del operón artificial el promotor inducible por arabinosa P<sub>BAD</sub> contenido en el plasmidio pBAD 33 que posee la secuencia:

5'- GTTTCTCCATACCCGTTTTTTTTGGGCTAGC-3'

Esto llevó a replantear la estrategia para el diseño del operón artificial para la incorporación de los genes *pdC* y *adhB* en *Pseudomonas aeruginosa*, la que se programó en 5 etapas: primero construir un fragmento que contenga el gen *pdC* de *Z. mobilis* con un adaptador de 33 bp en la región 3' de esta construcción. Posteriormente realizar una construcción que contenga el gen *adhB* de *Z. mobilis* con una región adaptadora de 47 bp en la región 5' que sea complementario a la secuencia del gen *pdC* y que contenga un sitio de unión a ribosoma, y en la región 3' agregar una secuencia terminadora de la transcripción. Luego unir estos dos fragmentos generando una

construcción que contenga el gen *pdh* y el gen *adhB* con su respectivo sitio de unión al ribosoma y en la región 3' el terminador transcripcional. Finalmente adicionar la región Shine-Dalgarno río arriba del gen *pdh* e insertar esta construcción en el vector pBAD33 (**Figura 12**).

La estrategia diseñada permitió construir el fragmento *pdh*-adp de 1740 bp (pPD-B) y el fragmento *adp2-adhB*-term de 1247 bp (pAD-B), como lo muestran las **Figuras 23 y 26**. Pero el empalme de ambas construcciones según la estrategia diseñada fue infructuosa, pese a los repetidos intentos y modificaciones en las condiciones de la reacción de PCR, generándose siempre un sinnúmero de amplicones inespecíficos. La opción de que las regiones adaptadoras de 33 bp insertadas río abajo de *pdh* y río arriba de *adhB* no complementaran parecería una explicación razonable para no obtener producto, pero el análisis de la secuencia de la región 3' de la construcción pPD-B (**Figura 25**) y el análisis de la secuencia de la región 5' de la construcción pAD-B (**Figura 28**) muestran que existe complementación de las secuencias adaptadoras insertadas.

La opción alternativa de unir el fragmento *pdh*-adp de 1740 bp con el fragmento *adp2-adhB*-term de 1247 bp, empleando T4 DNA ligasa permitió obtener una construcción de 2954 bp denominada pCL27-B, que si bien contenía ambos genes, estos no están en la orientación necesaria para continuar con la construcción del operón artificial como se tenía diseñado.

El análisis fenotípico de la actividad alcohol deshidrogenasa mediante placas con indicador para aldehído, mostró que la orientación del fragmento *adp2-adhB*-term, en la construcción pAD-B, es contraria a la localización del promotor  $P_{lac}$  que se encuentra en el vector pSC-B, ya que no cambió de color. Esto se correlaciona perfectamente con los resultados del análisis que se realizó para la secuencia que se muestra en la **Figura 29**, ya que la secuencia de la región 3' se obtuvo secuenciando con el primer M13r, lo que implica que el gen *adhB* no está en fase con el promotor  $P_{lac}$ . Situación similar ha sido descrita por **Conway y cols (1987b)** cuando analizaron diversos clones que contenían el gen de la enzima ADHII clonada en el vector pUC18.

Por otra parte el análisis fenotípico mediante placas con indicador para aldehído del fragmento *adp2-adhB*-term en la construcción pCL27-B, muestra que el gen *adhB* está en una orientación en fase con el promotor  $P_{lac}$  que se encuentra en el vector pSC-B, ya que la placa cambió de color (**Figura 32**). Estos datos sumados a los análisis mediante PCR de la construcción pCL27-B (**Figura 30 y Tabla 6**) nos hace especular que la orientación de la

ligación obtenida entre genes *pdv* y *adhB* fue divergente y que *adhB* quedó en fase con el promotor  $P_{lac}$  como lo esquematiza la **Figura 33**.



**Figura 33.** Esquema de la organización del operón artificial contenido en la construcción pCL27-B.

..

## 7. CONCLUSIONES

1. Las secuencias de los genes *pdh* y *adhB* clonados de *Zymomonas mobilis* CDBB-B-603 muestran un alto porcentaje de identidad (sobre el 98%) con las secuencias de los genes *pdh* y *adhB* de otras *Zymomonas mobilis* disponibles en la base de datos GenBank, lo cual indica que estos genes poseen un bajo polimorfismo.
2. A partir del diseño realizado para la construcción del operón artificial que contiene los genes *pdh* y *adhB* de *Zymomonas mobilis* sólo fue posible obtener las construcciones *pdh*-adp (1740 pb) y adp2-*adhB*-term (1247 pb) cuyo tamaño concuerda con el tamaño teórico esperado.
3. La amplificación mediante PCR del fragmento *pdh*-adp-*adhB*-term fue el punto crítico del diseño experimental planteado que no permitió obtener el operón artificial que contiene los genes *pdh* y *adhB* de *Zymomonas mobilis* para producir etanol.
4. Mediante la ligación de los fragmentos *pdh*-adp y adp2-*adhB*-term empleando T4 DNA ligasa se obtuvo la construcción de 2954 bp (pCL27-B) que contiene los genes *pdh* y *adhB* de *Z. mobilis* CDBB-B-603.
5. El análisis fenotípico de la construcción pCL27-B, empleando placas indicadores de aldehídos, mostró que el gen *adhB* se encuentra en fase con el promotor P<sub>lac</sub> presente en el vector de clonamiento.

## 8. REFERENCIAS

1. Bai, F.W., Anderson W.A., Moo-Young M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotech Advan* 26:89-105.
2. Becker, J., Boles, E. (2003). A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol. *Appl Environ Microbiol* 69:4144–4150.
3. Béguin, P., Aubert, J.P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev* 13: 25-58.
4. Beuken, E., Vink, C., Bruggeman, C.A. (1998). One-Step procedure for screening recombinant plasmid by size. *Biotechniques* 24:748-750.
5. Chandel, A.K., Chandrasekhar, G., Radhika, K., Ravinder, R., Ravindra, P. (2011). Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. *Biotechnol. Mol Biol Rev* 6: 8-20.
6. Centi, G., Fornasiero, P., Kaltschmitt, M., Miertus, S., Muller-Langer, F., Ronsch, S., Sivasamy, A., Thran, D., Vogel, A., Zinoviev, S. [En línea] Survey of Future Bio-fuels and Bio-Based Chemicals, ICS-UNIDO, Trieste 2008 [Fecha de consulta: 13 de 07 de 2012], disponible en <http://www.ics.trieste.it>
7. CNE; INFOR; GTZ (Comisión Nacional de Energía; Instituto Forestal; Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, 2007) [En línea] Disponibilidad de residuos madereros - Residuos de la industria primaria de la madera, disponibilidad para uso energético. Octubre de 2007 [Fecha de consulta: 17 de 02 de 2012], disponible en: <http://www.cne.cl>
8. Conway, T., Osman, Y.A., Konnan, J.I., Hoffman, E.M. and Ingram, L.O. (1987a) Promoter and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *J bacterial* 169: 949-954.
9. Conway, T., Sewell, G.W., Osman, Y.A. and Ingram, L.O. (1987b) Cloning and Secuencing of the Alcohol Dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. *J Bacteriol* 169:2591-2597.
10. Deanda, K., Zhang, M., Eddy, C., Picataggio, S.(1996). Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Appl Environ Microbiol* 62:4465-4470.



11. Demirbas, A. (2006b). Biodiesel production via non-catalytic SCF method and biodiesel fuel characteristics. *Energy Conv Manag* 47: 2271–2282.
12. Dermot, H., Babcock, B., Fabiosa, J., Tokgoz, S., Elobeid, A., Yu, T., Dong, F., Hard, C., Chavez, E., Pan, S., Carriquiry, M. and Dumortier, J. (2009). Biofuels: Potential Production Capacity, Effects on Grain and Livestock Sectors, and Implications for Food Prices and Consumers. *J Agric Econ* 41: 465-491.
13. Dien, B.S., Cotta, M.A., Jeffries, T.W. (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:258-266.
14. Eisenberg, R.C., Butters, S. J., Quay, S.C., Friedman (1974). Glucosa uptake and hophosphorylation in *Pseudomonas Fluorens*. *J Bacteriol* 120:147-153.
15. Eliasson, A., Christensson, C., Wahlbom C.F., Hahn-Hägerdal B. (2000b). Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol* 66:3381–3386.
16. Elobeid, A., Hart, C. (2007). Ethanol expansion in the food versus fuel debate: How will developing countries fare?. *J agric Food In* 5:1-23.
17. Elrod, R. P., Braun, A. C. (1942). *Pseudomonas aeruginosa*: Its rôle as a plant pathogen. *J Bacteriol* 44: 633-645.
18. Falcao de Morais, J.O., Rios, E.M., Calazans, G.M.T., Lopes, C.E. (1993). *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco FederalUniversity. *J Biotechnol* 31:75-91.
19. Garcia, A.M., Ponce E. (2003). Metabolismo del carbono en microorganismos de interés biomédico y biotecnológico: Vía de Entner-Doudorof. *Bioteconología Aplicada*, 20:85-94.
20. Gárdonyi, M., Hahn-Hägerdal B. (2003). The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol* 32:252-259.
21. Gold, R.S., Meagher, M.M., Tong, S., Hutkins R.W., Conway, T (1996). Cloning and expression of the *Zymomonas mobilis* “production of ethanol” genes in *Lactobacillus casei*. *Curr Microbiol* 33:256-260.
22. Guzman, L., Belin, D., Carson, M.J., Beckwith, J. (1995). Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose PBAD Promoter. *J Bacteriol* 177:4212-4130.

23. Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Jeppsson, M., Gorwa-Grauslund, M.F. (2007). Metabolic Engineering for Pentose Utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 108: 147-177.
24. Hoppner, T.C., Doelle, H.W. (1983). Purification and kinetics characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 17:152-157.
25. Howard, R. L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E. L., Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr J Biotechnol* 2: 602-619.
26. Ingram, L.O., Conway, T., Clark, D.P., Sewell, G.W., Preston, J. F. (1987). Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 53: 2420-2425.
27. Ingram, L.O., Gomez, P.F., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B.E., Yomano, L.P., York, S.W. (1998). Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnol Bioeng* 58: 204-214.
28. Jeppsson, M., Johansson, B., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa-Grauslund, M.F. (2002). Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose. *Appl Environ Microbiol* 68:1604-1609.
29. Kinoshita, S., Kakizono, T., Kadota, K., Das, K., Taguchi, H. (1985). Purification of two alcohol dehydrogenases from *Zymomonas mobilis* and their properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 22:249-254.
30. Lindner, P. (1928). Gärungsstudien über Pulque in Mexiko. *Bericht des Westpreussischen Botanisch-Zoologischen Vereins* 50:253-255.
31. Ma, F., Hanna, M.A. (1999). Biodiesel production: a review. *Bioresour Technol* 70:1-15.
32. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. Nutrition and metabolism. Brock biology of microorganisms. 10<sup>th</sup> ed. NJ:Prentice –Hall; 2000.
33. Mclean, B.W., Wiseman, S.L., Kropinski, A.M (1997). Functional analysis of sigma-70 consensus promoters in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 43:981-985.

34. Merino, E., Jensen, R.A., Yanofsky, C. (2008). Evolution of bacterial *trp* operons and their regulation. *Curr Opin Microbiol* 11: 78–86.
35. Mielenz, J. R. (2001) Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Curr Opin Microbiol* 4:324-329.
36. Miroux, B., Walker, J.E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* 260: 289–298.
37. Mohagheghi, A., Evans, K., Chou, Y.C., Zhang, M. (2002). Cofermentation of Glucose, Xylose, and Arabinose by Genomic DNA–Integrated Xylose/Arabinose Fermenting Strain of *Zymomonas mobilis* AX101 *Appl Biochem Biotechnol* 98:885-898.
38. Neale, A. D., Scopes, R.K., Kelly, J.M., Wettenhall, R. E. H. (1986). The two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*: purification by differential dye ligand chromatography, molecular characterization and physiological role. *Eur J Biochem* 154:119-124.
39. Nichols, N., Dien, B., Bothast, R. (2003). Engineering lactic acid bacteria with pyruvate decarboxylase and alcoholdehydrogenase genes for ethanol production from *Zymomonas mobilis*. *Ind Microbiol biotechnol* 30:315-321.
40. Nissen, T.L., Anderlund, M., Nielsen, J., Villadsen, J., Kielland-Brandt, M.C. (2001). Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisia* reresults in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool. *Yeast* 18: 19-32.
41. Ohta, K., Beall, D.S., Mejia, J.P., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O. (1991a). Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenaseII. *Appl Environ Microbiol* 57:893-900.
42. Ohta, K., Beall, D.S., Mejia, J.P., Shanmugam K.T., Ingram, L.O. (1991b). Metabolic Engineering of *Klebsiella oxytoca* M5A1 for ethanol production from xylose and glucose. *Appl Environ Microbiol* 57: 2810-2815.
43. Palleroni, N.J. (2005). Pseudomonas. In: Brenner D.J, Krieg N.R., Staley J.T. and Garrity G.M.(Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> ed. Springerverlang New York, NY. 2:323-379.
44. Prodomou, C, Pearl, L.H. (1992). A novel Technique for total gene synthesis. *Protein Eng* 5: 827-829.

45. Raj, K.C., Talarico, L.A., Ingram, L.O., Maupin-Forlow, J.A. (2002) Cloning and characterization of the *Zymobacter palmae* pyruvate decarboxylase (pdc): comparison to bacterial homologues. *Appl Environ Microbiol* 68:2869-2876.
46. Richard, P., Verho, R., Putkonen, M., Londesborough, J., Penttilä, M. (2003). Production of ethanol from L-arabinose by *Saccharomyces cerevisiae* containing a fungal L-arabinose pathway. *FEMS Yeast Res* 3:185-189.
47. Rizzi, M., Erlemann, P., Buithanh, N.A., Dellweg, H. (1988). Xylose fermentation by yeasts. Purification and kinetic studies of xylose reductase from *Pichia stipitis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 29:148–154.
48. Romero, S. Desarrollo de una cepa etanológica a partir de *Bacillus subtilis*. Tesis para obtener el título de maestro en ciencias. Cuernavaca, México. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 2003. 77 h.
49. Romero, S., Merino, E., Bolívar, F., Gosset, G., Martinez, A. (2007). Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: Lactate dehydrogenase plays a key role in fermentative metabolism. *Appl Environ Microbiol* 73 (16): 5190-5198.
50. Sivasamy, A., Zinoviev, S., Foransiero, P., Miertus, S., Mller-Langer, F., Kaltschmitt, M., Vogel, A., Thraen, D. [En línea] Bio-Fuels: Technology Status and Future Trends, Technology Assessment and Decision Support Tools, ICSUNIDO, Trieste 2008. [Fecha de consulta 13 de 06 de 2012] disponible en <http://www.ics.trieste.it>
51. Sprenger, G.A., (1996). Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiol Lett* 145:301-307.
52. Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, S. Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K.-S., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S., Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nat* 406: 959-964.
53. Sun, Y., Cheng, J. (2002). Hidrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol* 83: 1-11.
54. Swings, J., De Ley, J. (1977). The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol Rev* 41:1-46.
55. Talarico, L.A., Gil, M.A., Yomano, L.P., Ingram L.O., Maupin-Furlow, J.A. (2005). Construction and expression of an ethanol production operon in Gram-positive bacteria. *Microbiol* 151: 4023-4031.

56. Walfridsson, M., Bao, X., Anderlund, M., Lilius, G., Bulow, L., Hahn-Hägerdal, B. (1996). Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus* xylA gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Appl Environ Microbiol* 62:4648–4651
57. Walfridsson, M., Anderlund, M., Bao, X., Hahn-Hägerdal, B. (1997). Expression of different levels of enzymes from the *Pichia stipitis* XYL1 and XYL2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on product formation during xylose utilisation. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:218–224.
58. Wang, Z., Chen, M., Xu, Y., Li, S., Lu, W., Ping, S., Zhang, W., and Lin, M. (2008). An ethanol-tolerant recombinant *Escherichia coli* expressing *Zymomonas mobilis* pdc and adhB genes for enhanced ethanol production from xylose. *Biotechnol Lett* 30: 657-663.
59. Wheals, A.E., Bassoc, L.C., Alves, D.M.G., Amorim, H.V. (1999). Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol.* 17: 482–487.
60. Wills, C., Kratofil, P., Londo, D., Martin, T. (1981). Characterization of the two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*. *Arch biochem biophys* 210:775-785.
61. Yahr, T.L., Parsek, M.R. (2006). *Pseudomonas aeruginosa*. *Prokaryotes* 6:704-713.
62. Yan, Y., Liao, J. (2009). Engineering metabolic systems for production of advanced fuels. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36: 471-479.
63. Yomano, L.P., York, S.W., Ingram L.O. (1998). Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2: 132-138.
64. Zaldivar, J., Borges, A., Johansson, B., Smits, H.P., Villas-Bôas, S.G., Nielsen, J., Olsson, L. (2002) Fermentation performance and intracellular metabolite patterns in laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:436–442.
65. Zhang, M., Eddy, C., Deanda, K., Finkelstein, M., Picataggio, S. (1995). Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science* 267:240-243.
66. Zhou, S., Inverson, Grayburn, W. S. (2008). Engineering a native homoethanol pathway in *Escherichia coli* B for ethanol production. *Biotechnol Lett* 30: 335-342.

