



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“Ingeniería Metabólica en *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de isobutanol”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

Gabriel Esteban Méndez Román

Director del Seminario de Título:

Dr. Juan Asenjo de Leuze

Co-Director del Seminario de Título:

Dra. Barbara Andrews

Patrocinante del Seminario de Título:

Dra. Claudia Stange K.

Santiago de Chile
2018



Santiago - Chile

INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr(ta) Gabriel Esteban Méndez Román.**

“Ingeniería Metabólica en *S. cerevisiae* para la producción de isobutanol”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Juan Asenjo de Leuze.

Director del Seminario de Título _____

Dra. Barbara Andrews

Co-Director del Seminario de Título _____

Dra. Claudia Stange K.

Patrocinante del Seminario de Título _____

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Jennifer Alcaino

Presidente Comisión _____

Dr. Marcelo Baeza

Evaluador _____

Índice de contenidos

Resumen	1
Abstract	3
1 Introducción.....	4
1.1 Biocombustibles.....	4
1.2 Butanol, síntesis y propiedades	6
1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio.....	9
1.4 Ruta de síntesis de Isobutanol	12
2 Objetivos	16
2.1 Objetivo General.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 Materiales y Métodos.....	17
3.1 Material Biológico y Condiciones de Cultivo	17
3.2 Plásmidos y partidores	18
3.3 Obtención de material genético.....	20
3.4 Técnicas de biología molecular	22
3.5 Electroporación <i>E. coli</i>	25
3.6 Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	26
3.7 Cuantificación de isobutanol por HPLC	27

4	Resultados	28
4.1	Obtención de fragmentos a utilizar.....	28
4.2	Ensamble del marco de lectura de <i>SkARO10</i> , módulos de expresión	29
4.3	Ensamble constructos de transformación	30
4.4	Transformación de <i>S. cerevisiae</i> con gen <i>kan</i> y ensayos de resistencia a G418.....	31
4.5	Transformación con <i>SkAro10</i> , fermentación y cuantificación de isobutanol	33
5	Discusión	36
6	Conclusiones.....	43
7	Referencias	44
Anexo A	Secuencias utilizadas	50
Anexo B	Producción específica y total de isobutanol	53

Índice de tablas

Tabla I: Usos y estructura de Isómeros del butanol.	6
Tabla II: Propiedades del butanol y otros combustibles.	7
Tabla III: Producción de butanol en distintos organismos.	9
Tabla IV: Cepas utilizadas.	17
Tabla V: Plásmidos utilizados.	18
Tabla VI: Partidores utilizados.	20
Tabla VII: Promotores, terminadores y genes utilizados.	21

Índice de figuras

Figura 1: Mecanismo de integración mediante recombinación homóloga <i>in vivo</i>	10
Figura 2: Ruta de síntesis del Isobutanol a partir de piruvato en <i>S. cerevisiae</i>	12
Figura 3: Comparación actividad de SkAro10 y ScAro10 con diversos sustratos.	14
Figura 4: Esquema de plásmidos MIR y CC para la integración en <i>S. cerevisiae</i> S288c y clonamiento en <i>E. coli</i>	19
Figura 5: Mecanismo Gibson Assembly.....	22
Figura 6: Amplificación de promotores: tHxT7p, TEF2p, PDC1p; terminadores: TPIIt, PGIIt, TDH2t; genes: <i>kan</i> , LIADHA ^{RE1} , <i>SkARO10a</i> , <i>SkARO10b</i> y secuencias de homología UP y DOWN.....	28
Figura 7: Esquema de ensambles por Gibson del gen <i>SkARO10</i> y módulos de expresión de la resistencia a G418, <i>SkAro10</i> y <i>LIAdhA^{RE1}</i>	29
Figura 8: Electroforesis del ensamble del gen <i>SkARO10</i> y los módulos de Kan, SkAro10 y LIAdhA ^{RE1}	30
Figura 9: Método empleado para la selección de transformantes resistentes a G418 heterocigotas y homocigotas.	31
Figura 10: PCR de colonias transformadas amplificando el gen <i>kan</i> (816pb).	32
Figura 11: Gráfico crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> a concentraciones de entre 0 y 700 µg/mL de G418 luego de 24 horas de cultivo.	33
Figura 12: Gráfico producción específica y total de isobutanol luego de 4 días de cultivo..	34
Figura 13: Índice relativo de crecimiento luego de 4 días de cultivo.	35

Lista de Abreviaturas

- aa: aminoácido
- ABE: Acetona, Butanol, Etanol
- ADH: Alcohol deshidrogenasa
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ADNg: Ácido desoxirribonucleico genómico
- DO: Densidad Óptica
- dNTP: Desoxinucleótido trifosfato
- h: Horas
- HPLC: Cromatografía líquida de alta presión
- KIVD: α -cetoacido descarboxilasa
- min: Minutos
- mg: Miligramo
- mL: Mililitro
- mM: Milimolar
- nM: Nanomolar
- pb: Pares de bases
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- μ L: Microlitro
- μ M: Micromolar
- μ m: Micrometro
- WT: Silvestre
- Co: Cobalto
- Rh: Rodio
- LB: Luria Bertani
- UV: Ultravioleta
- RPM: Revoluciones por minuto
- DTT: Ditioneitol
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- RID: Detector de índice de refracción

Resumen

La producción de biocombustibles como fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles busca presentar nuevas maneras de obtención que sean renovables y amigables con el ambiente. Dentro de estos biocombustibles surgen los alcoholes de fusel, como el butanol, el cual, al ser comparado con el etanol, presenta ventajas en su uso como combustible. Por otro lado, *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura que puede producir isobutanol a partir del catabolismo de valina, posee resistencia a altas concentraciones de alcoholes y condiciones favorables para el escalamiento y producción, lo que la hacen un modelo para la obtención de butanol; Sin embargo, una de las limitantes de este proceso, es su baja producción, por lo que existe un gran interés en lograr un aumento de ésta. Este trabajo se enfocó en obtener, mediante ingeniería metabólica en *S. cerevisiae*, cepas sobre productoras de isobutanol. Para esto se utilizó la ruta de Ehrlich, la cual naturalmente se realiza dentro de la mitocondria, exceptuando las dos últimas reacciones. Se seleccionaron las enzimas que catalizan estas dos reacciones, alcohol deshidrogenasa (*LIADHA^{RE1}*) y α -cetoisovalerato deshidrogenasa (*SkARO10*), provenientes de *Lactococcus lactis* y *Saccharomyces kudriavzevii* respectivamente, y, mediante la fusión del péptido señal de citocromo C oxidasa se destinaron a la mitocondria. Utilizando Gibson Assembly se ensamblaron estos genes a promotores y terminadores nativos de *S. cerevisiae*. La transformación se realizó por recombinación homóloga *in vivo* mediante electroporación con el fin de obtener transformantes estables. La integración de la construcción de interés se realizó en el cromosoma V en el gen *URA3*. La medición de la producción de alcoholes se realizó mediante HPLC. De este trabajo se obtuvieron finalmente cepas transformadas con el gen *SkARO10* de *S. kudriavzevii* con una producción de isobutanol de 19 mg/L, logrando

de esta manera observar que la transformación con el gen α -cetoisovalerato deshidrogenasa con expresión mitocondrial logra incrementar la producción de butanol al doble. Se propone que, para incrementar aún más la producción, es necesario integrar el gen de una enzima del tipo alcohol deshidrogenasa y utilizar una cepa industrial con producción basal de isobutanol mayor.

Abstract

Production of biofuels as an alternative energy source to fossil fuels looks for renewable and environmentally friendly alternatives. Fusel alcohols, such as butanol, have advantages as a fuel compared to ethanol. *Saccharomyces cerevisiae* is a yeast that has the biosynthetic route for isobutanol, high alcohol-resistance and favourable conditions for scaling-up and production. These features make *S. cerevisiae* a promising cell-factory for the production of butanol; however, this yeast naturally produces low quantities of this alcohol, which is a limitation to the process. Thus, there is a great interest in developing strains that over-produce isobutanol. The aim of this work was to obtain over-producer strains of isobutanol, by means of metabolic engineering of *S. cerevisiae* using the Ehrlich pathway, which occurs inside the mitochondria except the last two reactions. The enzymes that catalyze these two reactions were selected, alcohol dehydrogenase (*LIADHA^{RE1}*) and α -ketoisovalerate dehydrogenase (*SkARO10*) from *Lactococcus lactis* and *Saccharomyces kudriavzevii* respectively, and fused to the cytochrome C oxidase signal peptide for sorting to mitochondria. The Gibson Assembly technique was used to assemble these genes to native promoters and terminators from *S. cerevisiae*. To obtain stable transformants, the transformation was carried out by *in vivo* homologous recombination by electroporation. The construct was integrated in the chromosome V in *URA3* gene. Transformed strains with gene *SkARO10* from *S. kudriavzevii* produced 19 mg/L of isobutanol, indicating that transformation with the gene α -ketoisovalerate dehydrogenase with mitochondrial sorting increases production of butanol two-fold. Additionally, to reach higher levels of butanol production, integration of alcohol dehydrogenase, is needed, in addition to use an industrial strain with a higher basal production of isobutanol.

1 Introducción

1.1 Biocombustibles

Dentro del consumo de energía en Chile, la mayor cantidad de ésta es obtenida a partir de la quema de combustibles fósiles, con un 30%. Le sigue aquella obtenida del carbón con un 25% y posteriormente las obtenidas a partir de biomasa, principalmente leña (un 24%). En los próximos años se espera cambiar esta realidad aumentando la energía generada por medios renovables como la energía eólica y solar; sin embargo, los combustibles fósiles seguirán siendo una fuente importante de energía (Ministerio de Energía - Gobierno de Chile, 2015) trayendo con éstos las desventajas que poseen, la necesidad de importación, precios fluctuantes por el acontecer internacional y la emisión de gases contaminantes a la atmósfera (Energía 2050, Ministerio de Energía). Como solución a este problema se han estudiado los biocombustibles, combustibles generados a partir de biomasa mediante procesos tanto químicos como biológicos, los cuales presentan como ventaja, una disminución en la liberación de contaminantes a la atmósfera. Una de las grandes diferencias de la industria química de producción de combustibles versus la industria biológica está dada por los costos de infraestructura necesaria y el volumen de producción de una fábrica o refinería. La industria química tiene altos costos de infraestructura y requiere producir en grandes cantidades para reducir los costos por unidad de producción, lo que dificulta la creación de nuevas fábricas dado que requieren de una inversión inicial demasiado alta y se genera el concepto de economía de escala. Por otro lado, la industria de producción biológica posee costos de infraestructura inferiores, y una menor producción, lo que facilita la creación de nuevas industrias generando una economía de número en la cual para tener

una mayor producción total se precisa la creación de nuevas fábricas (Clomburg *et al.* 2017).

Los biocombustibles utilizan como materia prima recursos renovables, como la biomasa, y según cual utilice se clasifican como combustibles de primera, segunda o tercera generación (Lee y Lavoie, 2013). Los combustibles de primera generación son aquellos que utilizan biomasa de cultivos agrícolas destinados al consumo humano los cuales poseen azúcares simples de fácil degradación, pero que compiten directamente con la producción alimentos. Los biocombustibles de segunda generación utilizan biomasa lignocelulósica, usando tanto desechos de la industria agrícola como maderera, además de cultivos energéticos. Por último, la tercera generación utiliza como biomasa algas, las cuales poseen una serie de ventajas, ya que no compiten por el uso de suelo con el sector agrícola para la producción de biomasa, no utilizan grandes cantidades de fertilizantes ni de recursos hídricos y poseen hidratos de carbono de naturaleza no lignocelulósica lo que lo hace más accesible para su fermentación (Lee y Lavoie, 2013).

Los biocombustibles más utilizados son los alcoholes y dentro de estos destaca el etanol, cuyo uso se encuentra bien posicionado en países como Estados Unidos y Brasil (Pfromm *et al.*, 2010) ya que posee buenos rendimientos de producción; sin embargo presenta ciertas desventajas, como una baja capacidad calorífica y una alta higroscopicidad. Estas características implican que el etanol, no pueda ser usado directamente como combustible en los motores de combustión interna utilizados comúnmente, sin realizar modificaciones en el motor, por lo que, se emplea una mezcla de gasolina y etanol, con un máximo del 10 % de etanol para no generar daños en el motor. Frente a estas desventajas se inició el estudio de la producción de alcoholes de cadenas más largas los cuales tengan un mayor poder calorífico y una menor


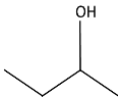
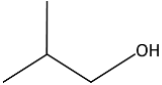
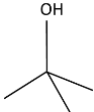
higroscopicidad, siendo una alternativa los alcoholes de fusel (Hazelwood et al., 2008; Rajesh Kumar y Saravanan, 2016).

1.2 Butanol, síntesis y propiedades

Los alcoholes de fusel son alcoholes de cadenas mayores a dos carbonos que se encontraron inicialmente tras la destilación de bebidas alcohólicas. Estos son generados durante la fermentación a partir del catabolismo de aminoácidos y se caracterizan por tener una gran implicancia en el sabor y olor de alimentos y bebidas fermentadas (Hazelwood et al., 2008).

La búsqueda de sabores y olores naturales promovieron el estudio de los alcoholes de fusel, pero dadas sus propiedades actualmente hay una gran variedad de usos que se le dan. Dentro de estos alcoholes destaca el butanol, un alcohol de cuatro carbonos que posee cuatro isómeros estructurales utilizados, según sus propiedades, en la industria de las pinturas, plásticos, perfumería, combustibles y solventes de limpieza (Tabla I) (Trindade y Santos, 2017).

Tabla I: Usos y estructura de Isómeros del butanol.

Isomero del butanol	Estructura molecular	Principales aplicaciones
n-butanol		Solvente para pinturas y resinas; intermediario químico en la industria de los plásticos; cosméticos; Aditivo de combustibles.
sec-butanol		Solvente, limpiador industrial, removedor de pinturas; perfumes y sabores artificiales.
Iso-butanol		Solvente y aditivo de pinturas, y tintas; limpiador industrial, removedor de pinturas; Aditivo de combustibles, eleva índice de octano.
Tert-butanol		Solvente, limpiador industrial, removedor de pinturas; denaturante de etanol; aditivo de gasolina,

(Liu et al., 2013a; Trindade y Santos, 2017)

Las isoformas que tienen mayor potencial como combustibles son el n- butanol y el iso-butanol, los que poseen propiedades similares las cuales se pueden observar en la Tabla II.

Tabla II: Propiedades del butanol y otros combustibles.

Combustible	n-Butanol	Isobutanol	Etanol	Gasolina
Poder calorífico inferior (LHV) (MJ/L)	26.9	26.6	21.4	30–33
Densidad (kg/m ³)	809.5	801.8	789.3	720–780
Número de Octano de investigación (RON)	96	105	130	88–98
Número de octano en motor (MON)	78	94	96	80-88
Número de cetano	25	-	8	0-10
Entalpía de Vaporización (kJ/kg a 25 °C)	707.9	684.4	919.6	~351
Temperatura de autoignición (°C)	343	415.6	434	~300
Solubilidad en agua a 20°C (H ₂ O%)	7.7	8.7	Miscible	Inmiscible
Viscosidad cinemática (cST) a 20 °C	3.6	8.3	1.5	0.37-0.44

(Regalbuto et al., 2012).

Al comparar el butanol con el etanol (alcohol de mayor uso como biocombustible actualmente) observamos que el butanol presenta varias ventajas. El etanol tiene un mayor riesgo de explosión por su menor presión de vapor, su menor densidad energética conlleva a un mayor gasto de combustible, posee una baja lubricación, por lo cual, las bombas de combustible y sistemas de inyección exhiben un menor tiempo de vida y dada su baja miscibilidad con el diésel se requiere el uso de co-solventes (Trindade y Santos, 2017). Mientras que el butanol conserva las ventajas de los alcoholes, posee mayor hidrofobicidad, lo que genera una mejor solubilidad con el diésel evitando así la necesidad del uso de co-solventes, una densidad energética 25% mayor al etanol, una menor volatilidad y un alto punto de ignición lo hacen más seguro para su manipulación y almacenamiento además una mayor viscosidad genera una mayor lubricación (Tabla II) (Rajesh Kumar y Saravanan, 2016; Trindade y Santos, 2017).

La producción actual de butanol se realiza mayoritariamente mediante oxo-síntesis, método que consiste en la utilización de aceites fósiles, CO y H₂ para la producción de aldehídos y en un segundo paso de hidrogenación para la producción de un alcohol, dependiendo del compuesto de partida es posible obtener los distintos isómeros del

butanol con una selectividad de hasta un 95%. Este proceso se realiza a altas temperaturas, utilizando catalizadores de Co o Rh y lo que trae un alto costo (Park, 1996; Weber y Falbe, 1970).

Por otro lado la producción biológica ha aumentado en los últimos años y ha generado un gran interés en las mejoras de rendimiento dada una serie de ventajas tanto económicas como ambientales (Clomburg et al., 2017). Dentro de la producción biológica el proceso más utilizado es la fermentación de *Clostridium acetobutylicum*, la llamada fermentación ABE que genera Acetona:Butanol:Etanol. Esta fermentación consta de dos partes; la fase de acumulación de ácidos orgánicos y la solventogénica y en ambas es necesario una anaerobiosis estricta; es en la fase solventogénica donde se produce acetona, butanol y etanol en proporción 3:6:1 (Branduardi et al., 2014). Existe una serie de puntos a mejorar en esta fermentación, tales como la fuente de biomasa a utilizar, tolerancia a la toxicidad producida por el butanol, el rendimiento y la purificación del producto final. En busca de la solución de estos problemas se han realizado una serie de estudios, cuyo objetivo es mejorar el rendimiento de la fermentación ABE (Kumar y Gayen, 2011; Liu et al., 2013a). Para sortear los problemas propios de *Clostridium* en la producción de butanol; la síntesis en conjunto de acetona y etanol y la necesidad de un ambiente anaeróbico se han utilizado nuevos organismos, dentro de esta área han surgido trabajos en *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* y *Saccharomyces sp* (Becerra et al., 2015). Algunos de los trabajos y la concentración de butanol obtenida se muestran en la Tabla III. Al considerar el uso de un nuevo microorganismo para la síntesis de butanol son varios los puntos a tomar en cuenta tales como; si posee una ruta nativa para su producción, tolerancia, escalamiento y facilidad

de trabajo. Considerando estas alternativas es que *S. cerevisiae* surge como candidato de interés.

Tabla III: Producción de butanol en distintos organismos.

Organismo	Producto	Concentración g/l	Referencia
<i>C.beijerinckii</i>	n-butanol	21	(Choi et al., 2014)
<i>C. tyrobutyricum</i>	n-butanol	20,5	(Yu et al., 2012)
<i>C. acetobutylicum</i>	n-butanol	20	(Lütke-Eversloh y Bahl, 2011)
<i>E. coli</i>	n-butanol	15	(Shen et al., 2011)
<i>S. cerevisiae</i>	n-butanol	0,83	(Shi et al., 2016)
<i>S. elongatus</i>	n-butanol	0,03	(Lan y Liao, 2012)
<i>B. subtilis</i>	n-butanol	0,02	(Nielsen et al., 2009)
<i>E. coli</i>	isobutanol	22	(Atsumi et al., 2008)
<i>C. glutamicum</i>	isobutanol	4,9	(Smith et al., 2010)
<i>B. subtilis</i>	isobutanol	3,83	(Li et al., 2012)
<i>S. cerevisiae</i>	isobutanol	1,62	(Hammer y Avalos, 2017)
<i>C. cellulolyticum</i>	isobutanol	0,66	(Higashide et al., 2011)
<i>R. eutropha</i>	isobutanol	0,27	(Lu et al., 2012)

1.3 ***Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio**

S. cerevisiae es un organismo que se ha utilizado desde largo tiempo atrás por su capacidad fermentativa, en la producción de bebidas alcohólicas. Actualmente, también se utiliza para la producción industrial de etanol para su uso como combustible (Argueso et al., 2009; Hazelwood et al., 2008).

El largo tiempo que se ha utilizado este organismo le ha otorgado una serie de ventajas sobre otros al momento de trabajar con él. Existe una gran cantidad de información, tanto a nivel genético como metabólico de *S. cerevisiae* que se puede encontrar en publicaciones o bases de datos como yeast genome (www.yeastgenome.org). Otra de las grandes ventajas es la existencia de métodos estandarizados para su manipulación que facilitan el trabajo investigativo en este organismo. Uno de los métodos de interés

para este trabajo es la transformación a nivel genómico mediante recombinación homóloga *in vivo*, la cual, utilizando la maquinaria de reparación de roturas en el ADN genómico de *S. cerevisiae*, permite integrar o sustituir fragmentos de ADN. Además, mediante la utilización de secuencias de homología es posible la integración sitio específica (Figura 1A) o la sustitución de un gen en particular (Figura 1B) (Gunyuzlu et al., 2001; Hua et al., 1997; Zgaga et al., 2001).

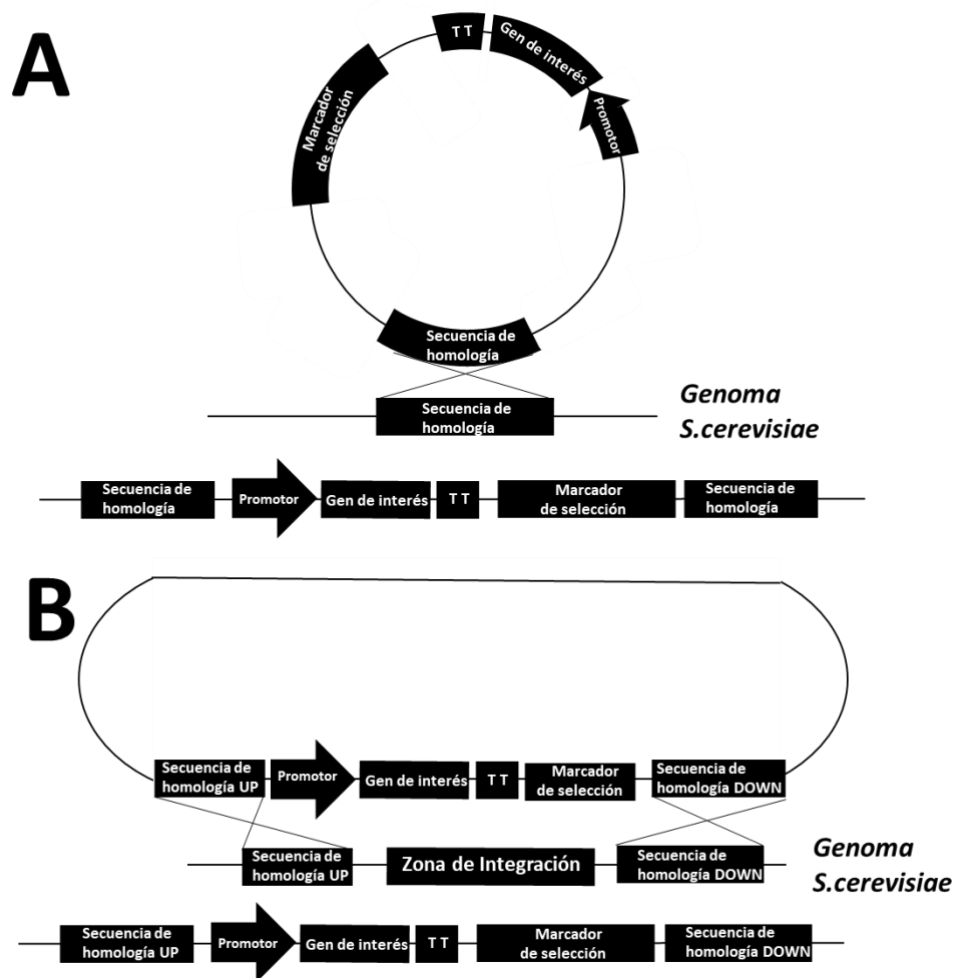


Figura 1: Mecanismo de integración mediante recombinación homóloga *in vivo*. **A.-** Integración mediante un evento de recombinación de plásmido circular cerrado (Zgaga et al., 2001) **B.-** Integración por sustitución mediante un doble evento de recombinación (Ma et al., 1987).

La elección del sitio de inserción no es al azar y existen estudios que demuestran que el nivel de transcripción dependen del sitio de inserción y la región promotora usada en el gen (Flagfeldt et al., 2009), Dentro de los sitios estudiados en este trabajo se encuentra el gen *URA3* ubicado en el cromosoma V de *S. cerevisiae* S288C, presenta una alta transcripción y al ser eliminado genera un fenotipo de auxotrofia (Lacroute, 1968).

Otro de los aspectos a considerar es la alta resistencia que *S. cerevisiae* tiene a los alcoholes, incluyendo al butanol (Lam et al., 2014). Esto es de importancia puesto que el butanol interactúa con las membranas desestabilizándolas, causando así toxicidad en la célula y, por ende, limitando la producción de este (Knoshaug y Zhang, 2009; Liu et al, 2017).

Si consideramos el uso actual de *S. cerevisiae* para la producción de etanol, existe una gran cantidad de infraestructura y personal calificado para la producción a gran escala utilizando este organismo. Por lo cual generar cambios operacionales a estos reactores para la producción de butanol, un producto de mayor valor agregado que el etanol, beneficiaría a la industria enormemente. Esto es lo que se llama retro-fitted y empresas como Gevo, Butamax y Butalco, han apostado por ello y han desarrollado gran interés en la producción de butanol en *S. cerevisiae* (Becerra et al, 2015; Rajesh Kumar y Saravanan, 2016).

1.4 Ruta de síntesis de Isobutanol

La ruta de síntesis de isobutanol en *S. cerevisiae* se puede separar en dos partes; la primera, la ruta de síntesis de la valina (la cual pasa por tres intermediarios previos) se lleva a cabo dentro de la mitocondria, utilizando como precursor el piruvato. La segunda parte, proveniente del catabolismo de la valina denominada ruta de Ehrlich, se lleva a cabo en el citoplasma y consta de tres reacciones hasta la síntesis del isobutanol (Figura 2) (Avalos, *et al.*, 2013).

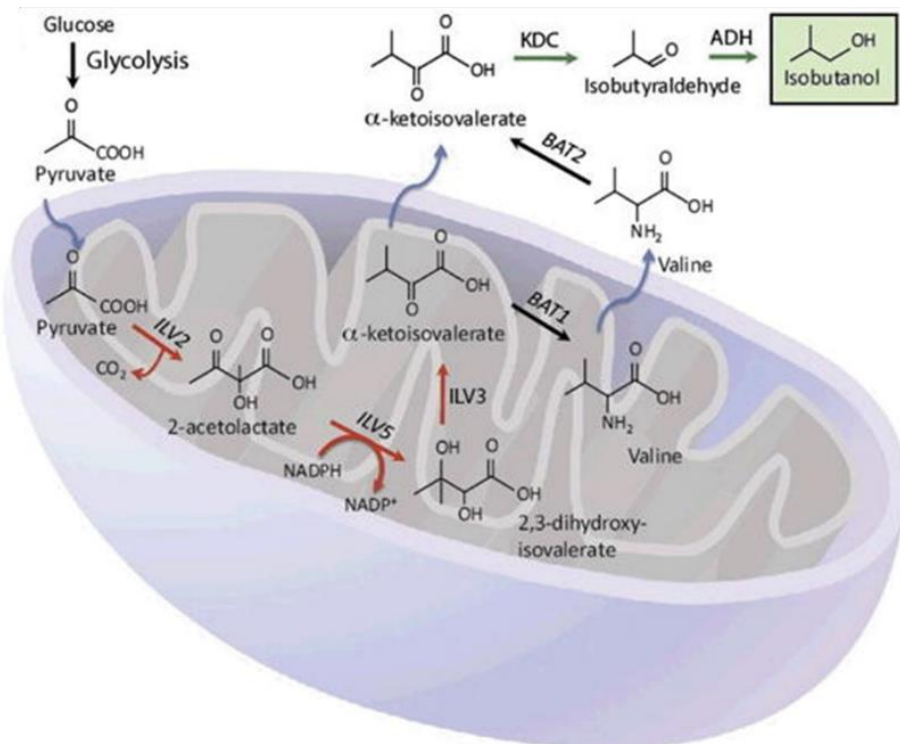


Figura 2: Ruta de síntesis del Isobutanol a partir de piruvato en *S. cerevisiae*. Las enzimas que participan en esta ruta son: Acetolactato sintasa (ILV2), Cetoácido reducto-isomerasa (ILV5), Dihidroxiácido deshidratasa (ILV3), Cetoisovalerato dehidrogenasa (KDC), Alcohol dehidrogenasa (ADH), aminotransferasa de aminoácidos de cadenas ramificadas (BAT1) y transaminasa de aminoácidos de cadenas ramificadas (BAT2) (Avalos, *et al.* 2013)

Numerosos estudios se han enfocado en la modificación de esta ruta para la producción de isobutanol y uno de los problemas encontrados, luego de la sobreexpresión de la ruta, es la baja especificidad que tienen algunas enzimas como la α -cetoacido descarboxilasa (KDC) y el alcohol deshidrogenasa (ADH), las cuales pueden catalizar la reacción de α -cetoácidos o aldehídos con cadena de carbonos de distintos largos, generando de esta manera alcoholes de cadenas largas no deseados (Avalos et al., 2013).

Con el objetivo de utilizar enzimas con mayor preferencias por los intermediarios de la ruta de síntesis de isobutanol se utilizó el gen de la α -cetoacidodescarboxilasa proveniente de *S. kudriavzevii* (SkAro10) la cual cataliza la reacción de descarboxilación del α -cetoisovalerato a isobutil aldehído más CO_2 , y presenta una mayor preferencia por el α -cetoisovalerato que la enzima proveniente de *S.cerevisiae* como se muestra en la Figura 3, en donde ScAro10 tiene su mayor actividad por fenilpiruvato y una actividad 10 veces menor por el α -cetoisovalerato mientras que SkAro10 posee mayor actividad con el α -cetoisovalerato poseyendo una actividad menor con los otros sustratos (Stribny et al., 2016).

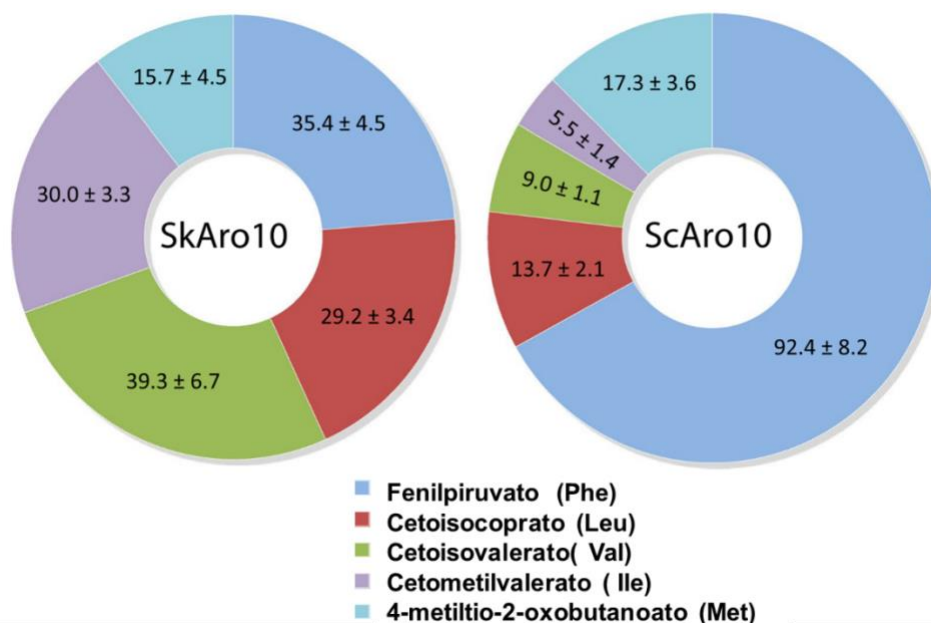


Figura 3: Comparación actividad de SkAro10 y ScAro10 con diversos sustratos. La actividad corresponde a $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg de proteína})^{-1}$. Junto al nombre de los distintos sustratos se muestra en paréntesis el aminoácido del cual son precursores (Stribny et al., 2016).

Siguiendo el mismo objetivo se trabajará con el gen mutado de la alcohol deshidrogenasa de *L. lactis* (LIAdh^{RE1}) la cual cataliza la reacción de síntesis del isobutanol a partir de isobutil aldehído y NADH. Esta enzima posee tres mutaciones en su dominio catalítico que genera un aumento de 30 en su actividad de síntesis de isobutanol (Liu et al., 2013b).

Otra de las estrategias a seguir es la compartimentalización de la ruta mediante destinación mitocondrial de las dos últimas enzimas de la ruta (KDC y ADH) que de forma nativa se encuentran en el citoplasma que ha demostrado generar un aumento en la producción de isobutanol (Avalos et al., 2013), esto debido a que el proceso no depende del transporte de los intermediarios de una locación a otra. Sin embargo, gran parte de la investigación en este punto se ha realizado mediante transformación plasmidial, lo cual requiere que se utilice un marcador que ejerza presión de selección para la

mantención del plásmido introducido, lo que no es conveniente para el escalamiento industrial.

Considerando estos antecedentes y la necesidad que existe por la producción de fuentes de energía renovables, donde los biocombustibles jugarán un rol importante en el futuro. Este trabajo buscó proveer una base tecnológica para la producción de isobutanol mediante la obtención de una cepa estable de *S. cerevisiae* S288C productora de este alcohol. Para esto se utilizó la técnica de transformación mediante recombinación homóloga *in vivo* permitiendo así una integración al sustituir el gen *URA3* utilizando como región de homología las secuencias flanqueantes al gen UP y DOWN (Flagfeldt et al., 2009). Las construcciones génicas utilizadas expresan dos enzimas claves en la ruta de síntesis de butanol, SkAro10 proveniente de *S. kudriavzevii* y AdhA^{RE1} proveniente de *L. lactis*, seleccionadas por su mayor especificidad por los intermediarios de la ruta de síntesis del isobutanol, en contraste con las enzimas nativas. Además, con el objetivo de generar un aumento en la producción de isobutanol, se compartimentó la ruta, mediante la fusión del péptido señal de la subunidad gamma del citocromo oxidasa C a SkAro10 y LIAdhA^{RE1}, permitiendo que enzimas que naturalmente se encuentran fuera de la mitocondria, se expresen dentro de esta (Avalos *et al*, 2013).

2 Objetivos

2.1 **Objetivo General**

Obtener una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* sobre-productora de isobutanol.

2.2 **Objetivos específicos**

1. Obtener y ensamblar genes y elementos regulatorios para la construcción de los módulos expresión de KDC, ADH y resistencia a G418.
2. Obtener cepas recombinantes de *S. cerevisiae* S288C, mediante integración genómica, del gen SkARO10.
3. Evaluar producción de Isobutanol de cepas recombinantes de *S. cerevisiae* en cultivos batch, mediante HPLC.

3 Materiales y Métodos

3.1 Material Biológico y Condiciones de Cultivo

Las cepas utilizadas y generadas en este trabajo se detallan en la Tabla IV.

Tabla IV: Cepas utilizadas.

Cepas y plásmidos	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> TOP10	Cepa de <i>E. coli</i> Genotipo: <i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ar leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen Inc.
<i>S. cerevisiae</i> S288c	Genotipo: <i>MATα, SUC2, gal2, mal2, mel, flo1, flo8-1, 1hap1, ho, bio1, bio6</i>	Disponible en CeBiB
<i>S. cerevisiae</i> S288c MIR 69	Auxótrofa, resistente a G418 Genotipo: <i>MATα, SUC2, gal2, mal2, mel, flo1, flo8-1, 1hap1, ho, bio1, bio6, Δura3::kan</i>	Este Trabajo
<i>S. cerevisiae</i> S288c MIR 70	Resistente a G418 Genotipo: <i>MATα, SUC2, gal2, mal2, mel, flo1, flo8-1, 1hap1, ho, bio1, bio6, kan</i>	Este Trabajo
<i>S. cerevisiae</i> S288c CC	Resistente a G418, Genotipo: <i>MATα, SUC2, gal2, mal2, mel, flo1, flo8-1, 1hap1, ho, bio1, bio6, kan, skaro10</i>	Este trabajo

Cultivos de *E. coli* TOP10 se realizaron en medio LB (triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v)), a 37 °C y 200 rpm. Alícuotas de los cultivos se almacenaron en solución de glicerol 40% (v/v) a -80°C. Para cultivos en placas se utilizó medio LB con agar al 1,5% (p/v).

Cultivos de *S. cerevisiae* S288C se realizaron en medio YPD (Extracto de levadura 1% (p/v), triptona 2% (p/v), glucosa 2% (p/v)) y en medio Sintético definido (SD) (Base nitrogenada de levaduras 0,17% suplementado o no con aa según los requerimientos, sulfato de amonio 0,5% (p/v), glucosa 2% (p/v)) a 30°C y 200rpm. Reservas de los cultivos se almacenaron en solución de glicerol 40% (v/v) a -80°C. Para cultivos en placa se utilizó medio YPD y SD con agar al 2% (p/v).

3.2 Plásmidos y partidores

Los plásmidos utilizados y generados en este trabajo se presentan en la Tabla V.

Tabla V: Plásmidos utilizados.

Nombre	Características	Referencia
pUC57	Vector clonación en <i>E. coli</i> , con resistencia a ampicilina	General Biosystems
pBlueScript-II-SK (+)	Vector clonación en <i>E. coli</i> , con resistencia a ampicilina, sistema <i>Blue-White Screening</i> .	Disponible en CeBiB
MIR	Vector clonación en <i>E. coli</i> , pBlueScript-II-SK (+) que contiene secuencias para la recombinación homóloga <i>in vivo</i> en cromosoma V de <i>S. cerevisiae</i> S288c y la inserción de la resistencia a G418.	Este trabajo
CC	Vector clonación en <i>E. coli</i> , pBlueScript-II-SK (+) que contiene secuencias para la recombinación homóloga <i>in vivo</i> en el cromosoma V de <i>S. cerevisiae</i> S288c, la inserción de la resistencia a G418 y la secuencia codificante para <i>SKARO10</i> .	Este trabajo

En La Figura 4 se muestra el esquema de los plásmidos MIR y CC ensamblados en este trabajo.

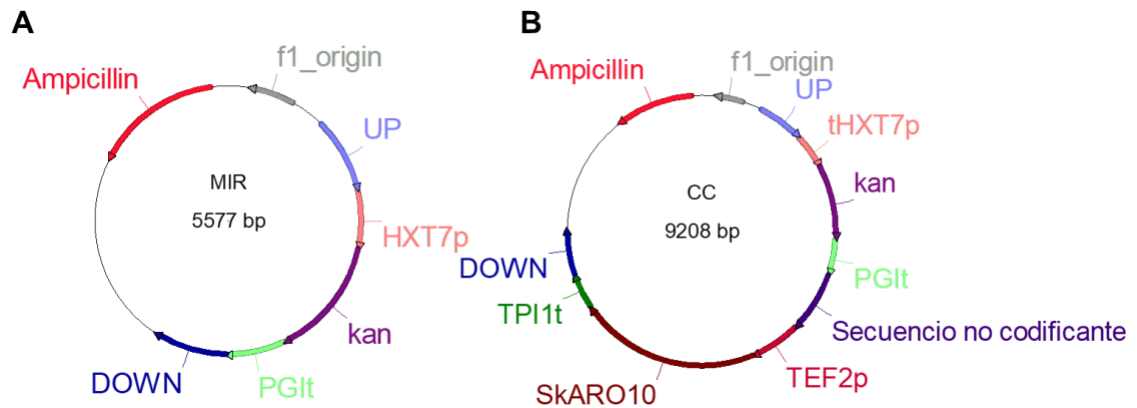


Figura 4: Esquema de plásmidos MIR y CC para la integración en *S. cerevisiae* S288C y clonamiento en *E. coli*. Se observan los módulos de inserción en donde, las secuencias UP y DOWN flanquean los módulos de expresión, el plásmido pBlueScript permite la replicación y la selección en *E. coli*. **A.-** Plásmido MIR, posee módulo de expresión de la resistencia **B.-** Plásmido CC posee el módulo de resistencia y módulo de expresión SkAro10.

Los partidores (Tabla IV) fueron diseñados mediante Cofla (pdtga.cofla.cl) y Oligocalc (biotools.nubic.northwestern.edu). Las colas para generar complementariedad en Gibson Assembly se diseñaron considerando una temperatura media de 53 °C, se muestran subrayadas en la Tabla VI. Los partidores fueron sintetizados en Integrated ADN Technologies Inc.

Tabla VI: Partidores utilizados.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Referencia
PDC1p_FW	CAGTATACCCATGCGACTGGGTGAGCAT	Este Trabajo
PDC1p_RV	AGACTAAGCATTTTGGATTGATTTGACTGTGTTATTTTG	Este Trabajo
ADH_FW	AAATCAATCAAAATGCTTAGTCTACGTCAATC	Este Trabajo
ADH_RV	AAGGAGTTAAATTTAGTGATGATGATGATGGTG	Este Trabajo
TDH2t_FW	ATCATCACTAAATTTAACTCCTTAAGTTACTTTAAT	Este Trabajo
TDH2t_RV	CGGCCCGCGAAAAGCCAATTAGTGTG	Este Trabajo
TEF2p_FW	CTTTTCGCGGGGCCGTATACTTACATATA	Este Trabajo
TEF2p_RV	TAGACTAAGCATGTTTAGTTAATTATAGTTTCGTTGAC	Este Trabajo
KDC_FW	ATTAACATAACATGCTTAGTCTACGTCAATCC	Este Trabajo
KDC_RV	ATTATATTAATCTTAGTGATGATGATGATGGTGTT	Este Trabajo
TP11t_FW	CATCATCACTAAGATTAATATAATTATATAAAAAATATTATCT	Este Trabajo
TP11t_RV	ATATGCTTCCCTATATAACAGTTGAAATTTGGATAA	Este Trabajo
UP22_FW	AAACGACGTTGAAATTGAGGCTACTGCG	(Flagfeldt <i>et al.</i> , 2009)
UP22_RV	ACGAGAAGTGGACTAGGATGAGTAGCAGCACGTTCC	(Flagfeldt <i>et al.</i> , 2009)
tHXT7p_FW	TCCTAGTCCACTTCTCGTAGGAACAATTTTC	Este Trabajo
tHXT7p_RV	ATATGGCTCATTTTTTGATTAATAAATAAAAAACTTTTTGT	Este Trabajo
G418_FW	TTTTAATCAAAAAATGAGCCATATTCAACGGG	Este Trabajo
G418_RV	GAGCGATTTGTTTAGAAAAACTCATCGAGCATC	Este Trabajo
PGI1t_FW	GTTTTTCTAAACAAATCGCTCTTAAATATATACC	Este Trabajo
PGI1t_RV-adh	AGTCGCATGGGTATACTGGAGGCTTCAT	Este Trabajo
PGI1t_RV-Down	ATGCTTCCCGGTATACTGGAGGCTTCAT	Este Trabajo
PGI1t-DOWN_FW	CAGTATACCGGGAAGCATATTTGAGAAGATGCGGC	Este Trabajo
TP11t-DOWN22_FW	CTGTTATATAGGGAAGCATATTTGAGAAGATGCGGC	Este Trabajo
DOWN22_RV	GGAAACGCTGCCCTACACGTTCCG	(Flagfeldt <i>et al.</i> , 2009)
SkARO10a_RV	TTGACGCAGCCCTTCTTTGCCGTTGTAC	Este Trabajo
SkARO10b_FW	AAAGAAGGGCTGCGTCAAGTTTATGAACATTT	Este Trabajo
UP22VFw	CGGTATCGATAAGCTTGATAAACGACGTTGAAATTGAGGCTACTGC	Este Trabajo
DOWNV22Rv	GGCTGCAGGAATTCGATGGAAACGCTGCCCTACACGTTCCG	Este Trabajo

3.3 Obtención de material genético

Las secuencias del marco de lectura de *SkARO10* y *LIADHA*^{RE1} fueron optimizados mediante la herramienta de optimización de Integrated ADN Technologies 2016, se les agregó la secuencia codificante Cox IV para el péptido señal a mitocondria de la citocromo C oxidasa (Avalos et al., 2013) y una secuencia de 6 histidinas (Anexo A). Los genes fueron sintetizados en General Biosystems, los cuales enviaron las secuencias insertas en el vector PUC57. El gen *SkARO10* se sintetizo en dos fragmentos, *SkARO10a*

y *SkARO10b* por disponibilidad de la compañía. Promotores y terminadores utilizados demostraron en trabajos previo una alta expresión de proteína recombinante en *S. cerevisiae* (Shao et al., 2009). Estos se amplificaron directamente desde el ADNg de *S. cerevisiae* S288C.

Las secuencias de homología empleadas para la integración por sustitución en el gen *URA3*, fueron amplificadas desde el ADN genómico de *S. cerevisiae* S288C (Flagfeldt et al., 2009).

En la siguiente tabla se muestran los genes, promotores, terminadores y secuencias de homología para la inserción utilizados, en Anexo A se muestran las secuencias correspondientes.

Tabla VII: Promotores, terminadores y genes utilizados.

Módulo de expresión	Nombre	Largo	Fuente	Referencia
Secuencia de homología para la Integración	UP	500 pb	<i>S. cerevisiae</i>	(Flagfeldt et al., 2009)
Kan	Promotor truncado del transportador de hexosa 7 (tHXT7p)	395 pb	<i>S. cerevisiae</i>	(Shao et al., 2009)
	Gen <i>kan</i>	816 pb	pPIC9K	Thermo Fisher Scientific
	Terminador de la fosfoglucoisomerasa (PGIt)	400 pb	<i>S. cerevisiae</i>	(Shao et al., 2009)
LIAdhA	Promotor de la piruvato descarboxilasa (PDC1p)	800 pb	<i>S. cerevisiae</i>	(Shao et al., 2009)
	Gen alcohol deshidrogenasa (<i>LIADHA^{RE1}</i>)	1119 pb	<i>L. lactis</i>	(Liu et al., 2013b)
	Terminador de la triosa-fosfato deshidrogenasa (TDH2t)	400 pb	<i>S. cerevisiae</i>	(Shao et al., 2009)
SkAro10	Promotor del factor de elongación de la traducción (TEF2p)	560 pb	<i>S. cerevisiae</i>	(Shao et al., 2009)
	Gen α -cetoácido descarboxilasa (<i>SkARO10</i>)	1902 pb	<i>S. kudriavzevii</i>	(Stribny et al., 2016)
	Terminador de la Triosa fosfato isomerasa (TPI1t)	400 pb	<i>S. cerevisiae</i>	(Shao et al., 2009)
Secuencia de homología para la Integración	DOWN	500pb	<i>S. cerevisiae</i>	(Flagfeldt et al., 2009)

3.4 Técnicas de biología molecular

3.4.1 Ensamble de fragmentos de ADN mediante Gibson Assembly

La construcción de los módulos de expresión se realizó utilizando los fragmentos de ADN mostrados en la Tabla VII, amplificados utilizando partidores con colas para agregar secuencias de homología con una temperatura media de 53°C necesarias para el ensamble de Gibson, reacción isotérmica que ocurre en tres pasos: Primero la T5 exonucleasa degrada el extremo 5' de los fragmentos de ADN exponiendo la secuencias homólogas, luego estas secuencias hibridan y la ADN polimerasa completa la secuencia dañada, finalmente la ligasa repara el enlace entre los fragmentos, obteniendo así la secuencia ensamblada (Figura 5A).

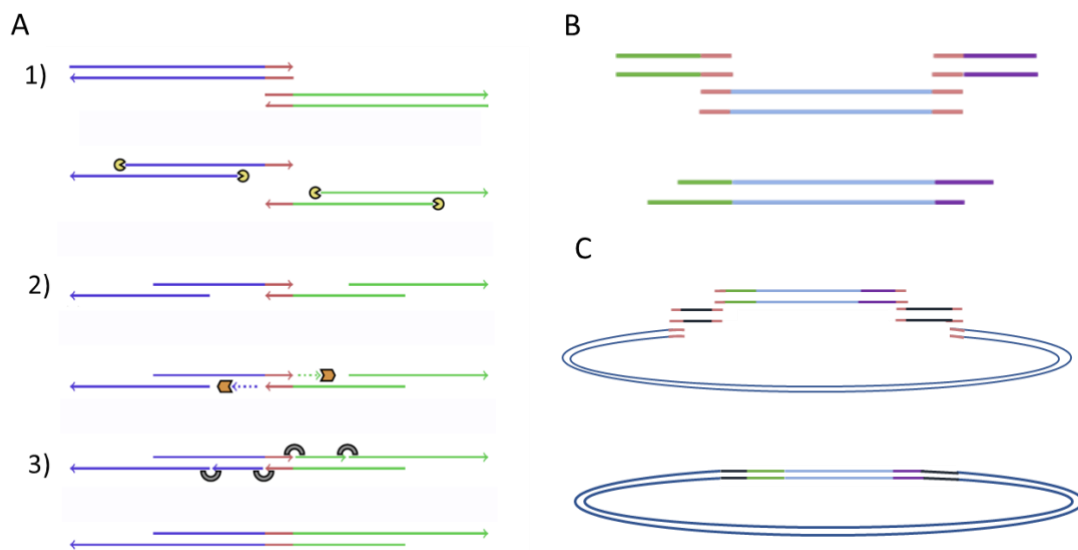


Figura 5: Mecanismo Gibson Assembly. **A.-** 1) Degradación extremos 5' por la T5 exonucleasa. 2) Hibridación de zonas de homología y polimerización de secuencia dañada por *Taq* polimerasa. 3) Ligación enlace fosfodiéster de los fragmentos de DNA mediado por *Taq* Ligasa (Gibson et al., 2009) **B.-** Estrategia utilizada para el ensamble lineal de los módulos de expresión **C.-** Estrategia utilizada para el ensamble en ADN circular de los módulos de integración.

Para la realización de 5 reacciones de Gibson se preparan 25 μ L de master mix 2x, compuesto por: 10 μ l de 5X isothermal buffer 0,2 μ l T5 exonuclease (1 U/ μ L), 0,6 μ l Phusion Polymerase, 5 μ l ADN *Taq* ligase, 9,2 μ l agua libre de nucleasas. Esta mezcla

es dividida en volúmenes de 5µL, al cual se le añaden 5 µl de ADN, los fragmentos a ensamblar se agregan en cantidades equimolares con un máximo de 0,8 ng de ADN total. La reacción de Gibson se realizó a 50 °C por una hora (Gibson et al., 2009).

Se utilizaron dos estrategias para la recuperación de los ensamblados obtenidos, la obtención de ensamblados lineales y circulares. Para la recuperación de ensamblados lineales (Figura 5B) se realizó electroforesis en gel de agarosa a partir de la reacción de Gibson, se identificó y purificó la banda del tamaño correspondiente al ensamblado, luego se amplificó mediante PCR para obtener una mayor cantidad de ensamblado. Esta estrategia se utilizó para la unión de ambos segmentos del marco de lectura SkARO10 (SkARO10a y SkARO10b), y la unión de promotor, gen y terminador de los módulos de expresión Kan, LIAdhA, *SkAro10* (Tabla VII).

La estrategia para la recuperación de ensamblados circulares consistió en generar zonas de homología en los fragmentos a ensamblar, con ambos extremos del plásmido pBlueScript, linealizado mediante la digestión con *EcoRV* (Figura 5C), y utilizar 10 µl de reacción para transformar mediante electroporación *E. coli* TOP10 y de esta manera clonar los plásmidos circularizados. Esta estrategia se utilizó para ensamblar ambos módulos de integración.

3.4.2 PCR

La amplificación de fragmentos de ADN se realizó mediante PCR utilizando el kit KOD Hotstart ADN polymerase (Novagen®), usando los partidores mostrados en la Tabla VI y en concordancia con estos se determinó la temperatura de annealing. PCR de colonias de *E. coli* se realizó tomando una colonia desde una placa y suspendiendo en 30 µl de agua destilada estéril, 15 µl se utilizaron para inocular 5 mL de medio LB líquido y los 15 µl restantes se incubaron a 100°C por 10 min para luego utilizar como ADN molde 1 µl

de éste. El PCR se realizó siguiendo el protocolo del kit de enzima Go Green® *Taq* Polymerase, se emplearon los partidores mostrados en la Tabla VI y en concordancia con estos se determinó la temperatura de Annealing.

3.4.3 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis se realizó utilizando gel de agarosa entre 0,5 al 1% (p/v), dependiendo de la resolución requerida, con 0,005% de GelRed (Biotium) y posterior iluminación con luz UV. Se utilizaron los marcadores de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™) y 1kb Ladder (New England Biolabs, Inc.).

3.4.4 Ligación en pBluescript

Para la ligación de fragmentos lineales de ADN en pBlueScript se linealizó el vector purificado mediante digestión con enzima *EcoRV* en primera instancia, luego éste fue purificado y se realizó la ligación utilizando la enzima T4 ligasa en proporción 1:5 vector-inserto. Se utilizó para la unión de los módulos de expresión kan, LIAdhA y SKAro10.

3.4.5 Extracción y ADN

La extracción de ADN plasmidial desde *E. coli* se realizó utilizando el kit GeneJet Miniprep (Thermo Scientific). Las secuenciaciones se realizaron en MacroGen y se analizaron mediante Benchling (benchling.com).

La extracción de ADNg desde *S. cerevisiae* se realizó siguiendo el protocolo de Promega ADN kit Extraction®. La extracción de ADN en gel de agarosa se realizó mediante el kit Gene Jet Gel Extraction® (Invitrogen). La cuantificación del ADN se realizó mediante espectrometría utilizando el espectrómetro MaestroNano (MaestroGen).

3.5 Electroporación *E. coli*

3.5.1 Generación de *E. coli* electrocompetente

Para la preparación de células electrocompetentes, se inocularon 500 mL de LB con 5 mL de cultivo incubado toda la noche, éste se creció hasta alcanzar una DO_{600nm} entre 0,5 y 0,65. luego se incubó en hielo durante 30 min y se centrifugó a 5000 RPM por 10 min a 4°C, el sobrenadante fue descartado y el pellet se resuspendió en 500 mL de glicerol 10 % previamente enfriado, se volvió a centrifugar y a resuspender el pellet en 250 mL de glicerol 10 %, se centrifugó a 4000 RPM por 10 min y resuspendió en 10 mL, se volvió a centrifugar a 4000 RPM por 10 min y se resuspendió en 2mL de glicerol 10%. Finalmente, las células se dividieron en volúmenes de 60 µl y almacenaron a -80°C.

3.5.2 Transformación y selección

La transformación por electroporación de *E. coli* se realizó agregando 3 µl de vector a 60 µl de células electrocompetentes y se incubó por 5 min en hielo, luego las células se pasaron a una cubeta de electroporación, previamente enfriada, y se dio un pulso de 2.200V. Inmediatamente las células se resuspendieron en 1 mL de medio LB líquido a 37° y se incubaron durante 1 hora en tubo eppendorf de 1,5 mL a 200 RPM. Posteriormente, las células se sembraron por extensión en placa LB-agar suplementado con ampicilina (100 µg/mL), IPTG (0,5mM) y X-gal (80µg/mL). Se incubaron durante toda la noche a 37°C y se seleccionaron las colonias transformadas (colonias blancas). A éstas se les realizó PCR de colonias utilizando los partidores universales M13 y en caso de resultar positivos se crecieron en medio LB líquido suplementado con ampicilina (100 µg/mL) para la extracción de ADN plasmidial y posterior secuenciación.

3.6 Transformación de *S. cerevisiae*

3.6.1 Transformación de *S. cerevisiae*

Para la transformación de *S. cerevisiae* S288C se inoculó 100 mL de YPD con 500 μ L de cultivo incubado toda la noche, para alcanzar una DO_{600nm} de 0,1 y se incubó hasta llegar a una DO_{600nm} entre 0,7 y 1,5. Una vez alcanzado este punto, se centrifugó a 5000 RPM por 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 25mL de (LiAc 100mM /DTT 10mM/Tris-HCl10mM pH7.5/EDTA 1mM) y se incubó por 1 hora. Luego se centrifugó a 6000 RPM por 5 min a 4°C y se resuspendió el pellet en 25 mL de agua fría estéril, se volvió a centrifugar y resuspender en 10 mL de sorbitol 1 M frío, se centrifugó nuevamente y se resuspendió en 100 μ l de sorbitol 1 M. Se tomó 40 μ l de células y se agregó 500 ng de vector circular con el módulo de integración. Se Incubó por 5 min en hielo para luego traspasar las células a una cubeta de electroporación fría y aplicar pulso de 1,5kV para inmediatamente resuspender en 1 mL de sorbitol frío 1M (mezclar suavemente), luego se centrifugó a 6000 RPM por 5 min, se resuspendió en 1mL de YPD líquido y se incubó toda la noche. Al día siguiente se sembró por el método de extensión en placas YPD-agar suplementado con 300 μ g/mL de G418 y se incubó durante 3 días a 30°C

3.6.2 Selección de transformantes

La selección de la transformación se realizó en 3 etapas. En primer lugar, se seleccionaron las colonias que crecieron luego de 3 días en medio selectivo, las que se sembraron por el método de estrías y se incubaron nuevamente por 3 días en medio selectivo. Luego, se seleccionaron colonias de éstas y se sembraron en duplicado en medio SD-agar y medio YPD-agar-G418, y se incubaron nuevamente por 3 días, se seleccionaron las colonias que solo crecen en YPD y en medio SD e YPD para

seleccionar transformantes que sustituyesen el gen *URA3* o que se integraran sin sustituirlo, respectivamente. Las colonias seleccionadas se crecieron en medio YPD líquido suplementado con 300 µg/mL de G418 y se realizó extracción de ADN genómico, luego se realizó PCR para la confirmación de la inserción de los genes de interés.

3.6.3 Análisis de resistencia de *S. cerevisiae* a G418

Se realizó análisis de resistencia en medio YPD líquido e YPD-agar suplementado con concentraciones variables de G418 e incubando por un máximo de 5 días. En placas se observó la aparición de colonias a los 3 y 5 días mientras que en medio líquido se midió DO_{600nm} a las 24 horas de cultivo a cepas WT, transformantes auxótrofas y protótrofas para el gen de resistencia.

3.7 Cuantificación de isobutanol por HPLC

Se realizaron cultivos en medio SD (suplementado con aa) con un volumen de 15 mL a 30°C, 200 rpm por 4 días. El cultivo de cada colonia se realizó en triplicado. El cultivo se filtró en un filtro de 0,2 µm y el filtrado se traspasó a viales de vidrio de 2 mL. Los viales fueron montados en el autosampler SiL-20Ac donde se almacenaron a 10 °C para ser cargados. Se cargaron 10 µl de muestra, se utilizó la columna Aminex HPX7h, fase móvil de H₂SO₄ 5 mM con un flujo de 0,6 mL/min, con el horno a 55°C en un ciclo de medición de 1h. El compuesto se detectó mediante la diferencia de índice de refracción utilizando RID-10^a Shimadzu y el programa utilizado para el análisis fue LC Solution Shimadzu. Como estándar se utilizó isobutanol (CAS 78-83-1, n°100984) para análisis de MERCK.

4 Resultados

4.1 Obtención de fragmentos a utilizar

La amplificación de promotores, terminadores y los fragmentos de inserción se realizó con los partidores presentados en la Tabla VI, a partir del ADN genómico de *S. cerevisiae* S288c, los fragmentos amplificados se muestran en la Figura 6A.

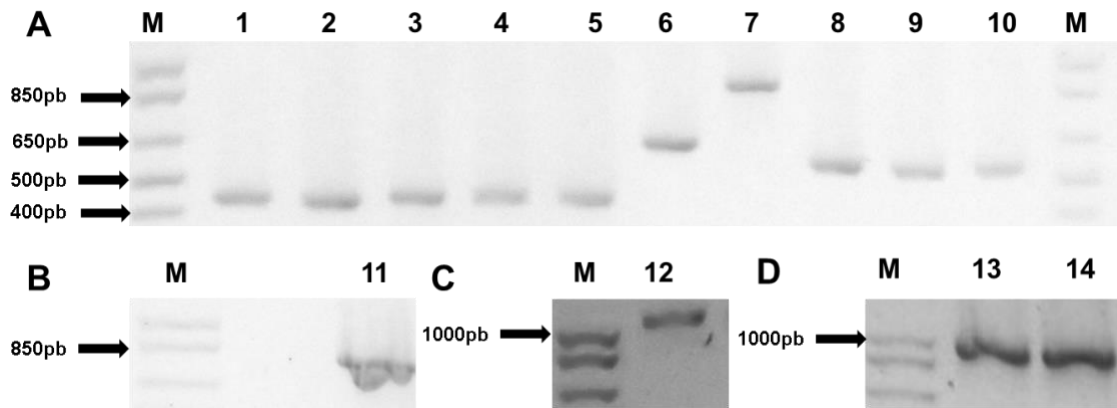


Figura 6: Amplificación de promotores: tHxT7p, TEF2p, PDC1p; terminadores: TPIIt, PGIIt, TDH2t; genes: *kan*, *LIADHA^{RE1}*, *SkARO10a*, *SkARO10b* y secuencias de homología UP y DOWN. Se muestran los distintos fragmentos de DNA obtenidos. **M.-** Marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. **A.-** 1: TPIIt (400pb), 2-3: PGIIt (400pb) 4: tHxT7p (400pb), 5: TDH2t (400pb), 6: TEF2p (560pb), 7: PDC1p (800pb), 8: UP (500pb), 9-10: DOWN (500pb). **B.-** 11: *kan* (816pb) **C.-** 12: *LIADHA^{RE1}*(1119pb). **D.-** 13: *SkARO10a* (1005pb), 14: *SkARO10b* (993pb).

El marco de lectura del gen *kan* (816pb), utilizado como marcador de selección para otorgar resistencia al antibiótico G418, se obtuvo a partir del vector pPIC9K utilizando los partidores presentes en la Tabla VI. Se realizó electroforesis para la observación (Figura 6B), luego fue purificado y almacenado.

Los genes *LIADHA^{RE1}* (1119pb) y *SkARO10* (1998pb) se sintetizaron en General Biosystems Inc. y fueron clonados en vectores pUC57 añadiendo en el extremo 5' del

marco de lectura la secuencia del péptido señal Cox IV (Anexo A) para la destinación mitocondrial además en el extremo 3' se adicióno la secuencia codificante para una cola de poli histidina. El marco de lectura del gen *SkARO10* se sintetizó en dos partes, *SkARO10a* y *b*, las que se visualizaron mediante electroforesis en gel (Figura 6C y 6D). Todos los fragmentos fueron purificados y almacenados a -20 °C.

4.2 Ensamble del marco de lectura de *SkARO10*, módulos de expresión

Una vez obtenido los fragmentos se ligaron mediante Gibson Assembly. En primera instancia se ensambló el marco de lectura del gen *SkARO10* a partir de los fragmentos *SkARO10a* y *SkARO10b*, obteniendo el gen de 2 kb el cual se observa en la Figura 7A-8A, a partir de este se ensambló el módulo de expresión para la enzima *SkAro10* mediante la unión del promotor *TEF2p*, el gen *SkAro10* y el terminador *TPI1t* para obtener un módulo de 3 kb (Figura 7A-8C). El módulo de expresión de resistencia se

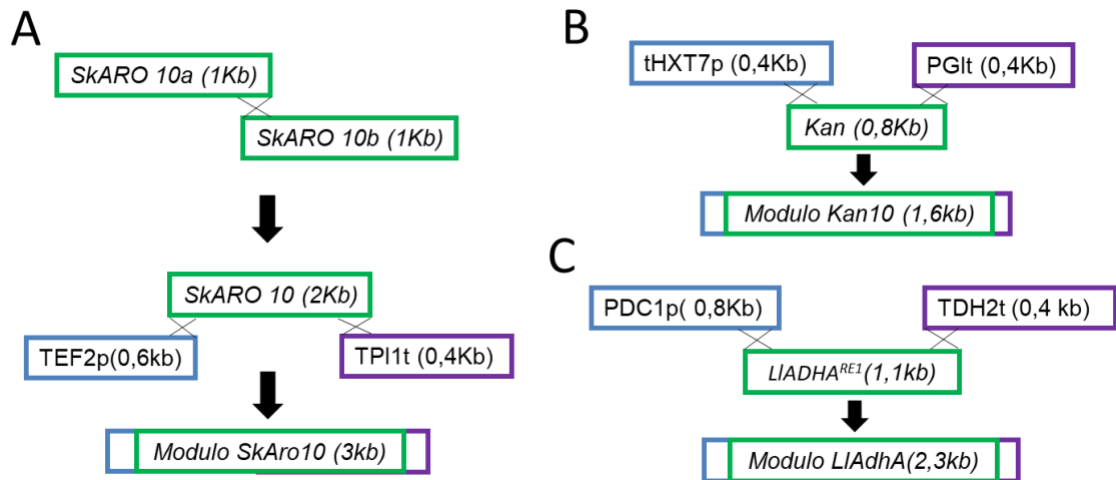
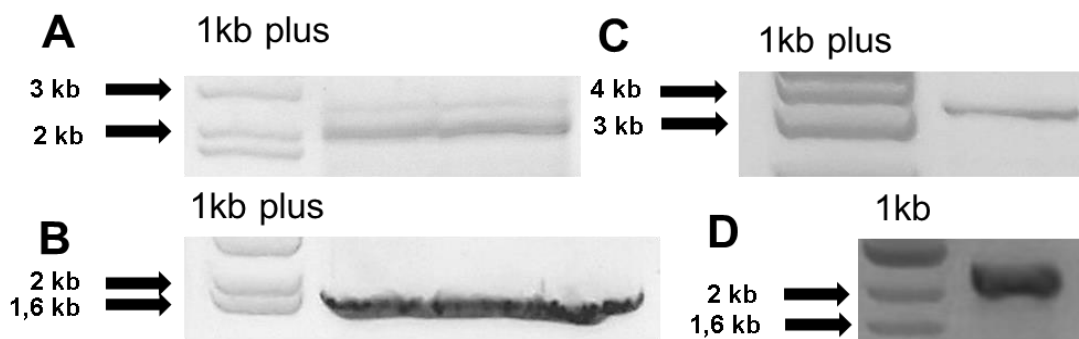


Figura 7: Esquema de ensamblajes por Gibson del gen *SkARO10* y módulos de expresión de la resistencia a G418, *SkAro10* y *LIAdhA^{RE1}*. **A.-**Ensamble del gen *skaro10* **B.-** Ensamble del módulo de expresión de resistencia **C.-**Ensamble del módulo de expresión se la enzima *SkAro10* **D.-** Ensamble del módulo de expresión para la enzima *LIAdhA^{RE1}*.

ensamblado utilizando el promotor *tHxT7p*, el gen *kan* y el terminador *PGLt* obteniendo un fragmento de 1,6 kb (Figura 7B-8B), para el ensamble del módulo de expresión de la enzima *LIAdhA^{RE1}* se utilizó el promotor *PDC1p*, el gen *LIADHA^{RE1}* y el terminador *TDH2t* para obtener un módulo de 2,1 kb (Figura 7D-8D). Todos los fragmentos fueron ligados al vector pBlueScript y perpetuado en *E. coli TOP10* los cuales se almacenaron a en glicerol 40% a -80°C.



4.3 Ensamble constructos de transformación

Se obtuvieron ensamblados para dos módulos de integración, el primero llamado MIR (Módulo de integración de la resistencia) consta del módulo de expresión de la resistencia (Figura 7B) y las secuencias de homología flanqueantes UP y DOWN, insertas en el vector pBlueScript como se muestra en la Figura 4A, el módulo fue validado mediante secuenciación.

El segundo módulo de Integración denominado CC está constituido por el módulo de expresión de la resistencia (Figura 7B), el módulo de expresión SKAro10 (Figura 7A) y las secuencias de homología flanqueantes UP y DOWN, insertos en el vector pBlueScript (Figura 4B), el módulo fue validado mediante secuenciación. Cabe mencionar que debido a uniones inespecíficas durante la construcción de este módulo no se logró ensamblar el módulo de expresión de LIADH y en su lugar existe una secuencia no codificante.

4.4 Transformación de *S. cerevisiae* con gen *kan* y ensayos de resistencia a G418

Se transformó *S. cerevisiae* S288C con el plásmido MIR para la integración genómica del módulo de resistencia, esto se realizó mediante electroporación con 500 µg de vector circular; como control negativo no se agregó ADN. El cultivo se sembró en placas YPD-Agar con 200 µg/mL y 300µg/mL de G418 (Figura 9A), las colonias obtenidas fueron re-plaqueadas como se muestra en la figura 9 B en YPD-agar 300µg/mL, luego sembradas en medio YPD-agar-G418 300µg/mL y en medio mínimo SD-agar para diferenciar transformantes que sustituyesen el gen *URA3* o que se integraran sin sustituirlo (Figura

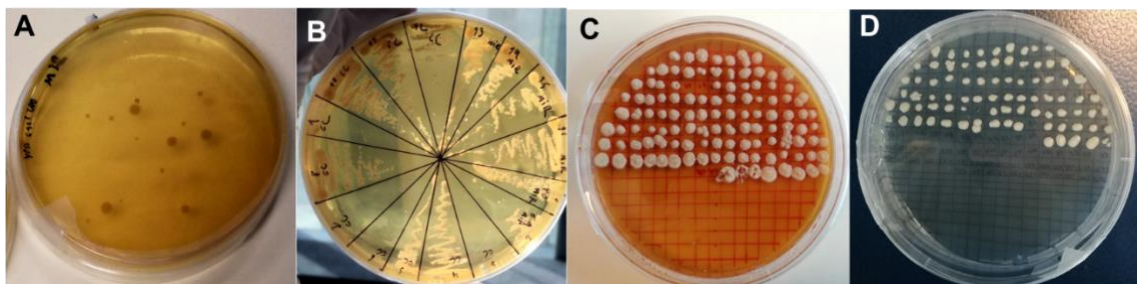


Figura 9: Método empleado para la selección de transformantes resistentes a G418 heterocigotas y homocigotas. **A**-Primer paso del proceso de selección, **B**.- Segundo paso proceso de selección **C**, **D**.- Tercer paso del proceso de selección. **A**, **B**, **C**.- corresponde a YPD-agar-G418. **D**.- corresponde a medio mínimo SD-Agar.

9C-D). Se obtuvo crecimiento de colonias sin transformar en 200µg/mL y una colonia en 300 µg/mL de G418, mientras que para las mismas concentraciones de antibiótico las colonias transformantes se obtuvieron una gran cantidad de colonias. Las colonias transformadas cultivadas en 300 µg/mL se seleccionaron para los siguientes pasos de selección donde se logran identificar colonias que no mantuvieron la resistencia en las 3 etapas de la selección (Figura 9B-C). El último paso de selección permitió distinguir entre colonias transformantes que se integraron sin sustituir el gen *URA3* (crece en ambas placas) y transformantes que sustituyeron el gen *URA3* (crece solo en medio YPD), puesto que al sustituir el gen *URA3* se genera auxotrofia al requerir la adición de uracilo para crecer. Se logró obtener una colonia transformante que sustituyo al gen *URA3* (auxótrofa), la colonia 69, y, de entre las colonias que se integraron sin sustituirlo (protótrofa), se seleccionó la colonia 70 para futuros experimentos. Las colonias fueron comprobadas mediante PCR de colonias amplificando el marco de lectura del gen *kan* (816 pb) (Figura 10).

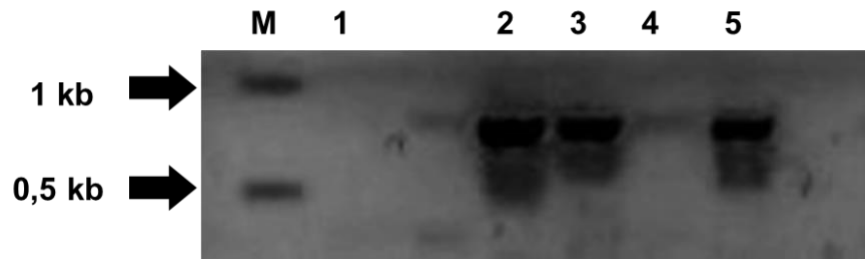


Figura 10: PCR de colonias transformadas amplificando el gen *kan* (816pb). **M.-** marcador de peso molecular 1kb Ladder New England Biolabs, Inc. **1.-** WT **2.-** Módulo MIR **3.-** colonia 69 MIR **4.-** colonia 15 CC **5.-** Colonia 70 MIR.

Las colonias 69 MIR, 70 MIR y WT fueron crecidas en medio YPD líquido con concentraciones entre 100 y 700 µg/mL de G418 para evaluar su resistencia, se midió DO_{600} luego de crecimiento durante toda la noche (Figura 11). En este gráfico no se

observan diferencias de resistencia a G418 entre la cepa auxótrofa y protótrofa hasta los 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mientras que en colonia WT se observa crecimiento hasta los 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

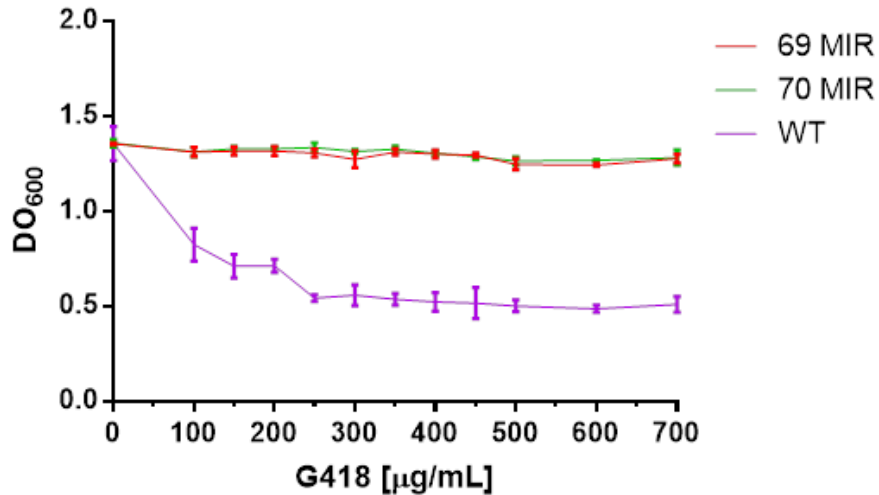


Figura 11: Gráfico crecimiento de *S. cerevisiae* a concentraciones de entre 0 y 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 luego de 24 horas de cultivo. Se observa densidad óptica de las colonias transformadas 69 MIR y 70 MIR, auxótrofa y protótrofa respectivamente y la colonia WT correspondiente a *S. cerevisiae* sin transformar. En donde se utilizó una DO_{600} de inóculo 0.5.

4.5 Transformación con SkAro10, fermentación y cuantificación de isobutanol

La transformación y selección se realizó según la descripción previa, a partir de este proceso se obtuvieron 19 cepas transformantes (Figura 12) que se insertaron sin sustituir el gen *URA 3* (Anexo B).

Las 19 colonias transformantes CC junto con la cepa WT y las colonias transformantes 69 MIR y 70 MIR se fermentaron durante 4 días en medio SD suplementado con aminoácidos. Al finalizar el cultivo se extrajo 1 mL para la medición de DO_{600} y se filtraron 2 mL, para la cuantificación de isobutanol. La determinación de la concentración de isobutanol se realizó mediante HPLC utilizando el detector RID que permite medir la

diferencia del índice de refracción, luego de realizar la curva de calibración se obtuvo la producción de isobutanol de cada colonia (Anexo B). A partir de estos datos se obtuvo el gráfico mostrado en la Figura 12, en donde el eje X muestra la concentración final de isobutanol en mg/L mientras que en el eje Y se muestra la producción específica de isobutanol en mg/(L·DO₆₀₀). A partir de este gráfico es posible observar la colonia 69 MIR que muestra una disminución en la producción de isobutanol y 2 principales grupos; uno en el que se muestra un aumento significativo en la producción y otro en que se comporta similar a la cepa WT. De éstas, la colonia con mayor producción de isobutanol es la colonia 15CC con una producción máxima de 19,4 mg/L.

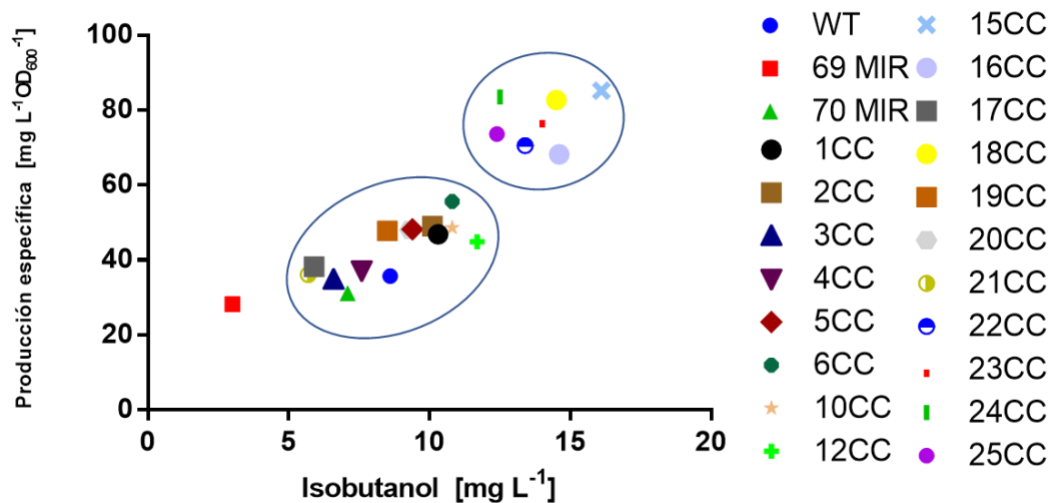


Figura 12: Gráfico producción específica y total de isobutanol luego de 4 días de cultivo. Se muestran las distintas colonias transformadas con el vector CC codificante para la enzima SkAro10 dirigida a la mitocondria, se utilizó como control la cepa sin transformar WT y las cepas transformadas solo con el módulo de resistencia 69 MIR y 70 MIR. Las mediciones se realizaron luego de 4 días de fermentación en medio SD suplementado con aminoácidos.

Al comparar el crecimiento de las colonias luego de 4 días de cultivo se observa que las colonias transformadas tienden a disminuir su crecimiento con respecto al WT, se observa una disminución significativa de la colonia auxótrofa 69 MIR y de las colonias 17CC, 21CC, 24CC y 25CC (Figura 13). Al comparar el crecimiento de las colonias por los grupos formados anteriormente de la producción de butanol se observa que las colonias que no muestran aumento significativo en la producción de isobutanol (Figura 13A) tienden a tener una menor disminución en su crecimiento con respecto a las colonias que muestran un aumento significativo en la producción de isobutanol (Figura 13B), pero sin diferencias significativas.

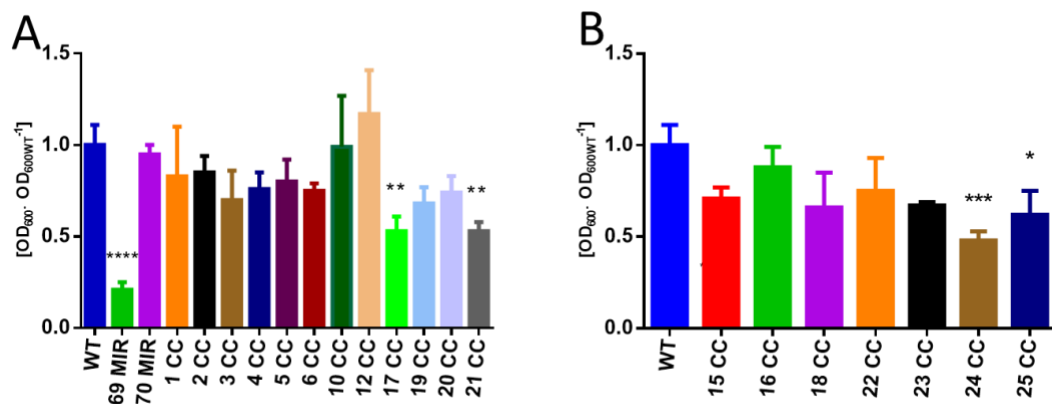


Figura 13: Índice relativo de crecimiento luego de 4 días de cultivo. El índice relativo de crecimiento se calculó dividiendo el crecimiento promedio de las distintas colonias por el crecimiento promedio de WT. Colonias con * muestran diferencia significativa al comparar con WT mediante test ANOVA de una vía. **A.-** Se muestran las colonias que no presentan un aumento significativo en la producción de isobutanol **B.-** Se muestran las colonias que presentan un aumento significativo en la producción de isobutanol

5 Discusión

Con el objetivo de obtener una cepa de *S. cerevisiae* con un aumento en la producción de isobutanol, se seleccionaron las dos últimas enzimas de la ruta de Ehrlich, KDC y ADH (Figura 2). Debido a que estas enzimas se encuentran ubicadas en el citoplasma, mientras que el resto de la ruta en la mitocondria, la destinación mitocondrial de estas enzimas aumenta la producción de isobutanol (Avalos et al., 2013) al no depender del transporte de los metabolitos intermediarios de una locación a otra; por otro lado, estas enzimas se caracterizan por una baja especificidad, lo que genera que al ser sobre expresadas se observa aumento de alcoholes u otros metabolitos no deseados (Avalos et al., 2013). Por esto es de interés encontrar enzimas que tengan mayor afinidad por los metabolitos específicos de la ruta del isobutanol. Se seleccionó la enzima SkAaro10 de *S. kudriavzevii*, por poseer una mayor afinidad por el α -cetoisovalerato que por otros sustratos (Figura 3) (Stribny et al., 2016) y la enzima LIAdhA^{RE1} de *L. lactis*, enzima mejorada mediante ingeniería de proteínas que permitió aumentar ~30 veces la actividad con isobutil aldehído como sustrato en comparación con la enzima nativa (Liu et al., 2013b). La secuencia génica de estas enzimas fue optimizada para *S. cerevisiae* y sintetizada añadiendo en el extremo 5' del marco de lectura, la secuencia codificante del péptido señal CoxIV necesaria para la destinación mitocondrial.

A partir de estos genes se construyeron los módulos de expresión utilizando promotores y terminadores nativos de *S. cerevisiae* (Figura 6, 7 y 8), descritos en Shao et al., 2009. En donde se seleccionaron promotores constitutivos con una alta expresión.

Como marcador de selección se utilizó el gen *kan* que codifica una aminoglucósido fosfotransferasa que otorga resistencia a G418, antibiótico de tipo aminoglucósido que

inhibe la síntesis de proteínas, tanto en procariontes como eucariontes (Hadfield et al., 1990). Este gen se obtuvo desde el vector pPIC9K Invitrogen™.

La construcción de los módulos se realizó mediante Gibson assembly, técnica que permite el ensamble de fragmentos de ADN, sin generar mutaciones en el sitio de unión (Figura 5) (Gibson et al., 2009).

Luego del ensamble, los 3 módulos se clonaron en pBlueScript. Estos fragmentos se utilizaron para el ensamble de los módulos de integración, en donde los módulos de expresión son flanqueados por las secuencias de homología UP y DOWN (Figura 4), necesarios para otorgar especificidad al sitio de integración genómica *in vivo*, descritos en Flagfeldt et al., 2009.

El ensamble del vector MIR, el cual, consiste en los fragmentos de homología UP y DOWN flanqueando el módulo de expresión Kan en el vector pBlueScript (Figura 4) la construcción se validó mediante secuenciación.

El ensamble del módulo de integración CC, conformado por los fragmentos de homología flanqueantes UP y DOWN, los módulos Kan, LIAdhA y SkAro10 y el vector pBlueScript linealizado, no se pudo llevar a cabo correctamente, pues en la reacción de Gibson assembly se ensambló una secuencia no codificante reemplazando al módulo ADH (Figura 4). Los resultados de secuenciación y búsqueda por homología en BLAST para la determinación del origen de este fragmento indicarían que corresponde a partes del módulo ADH no consecutivas. Esto puede deberse a una falta de integridad del fragmento utilizado en la reacción de ensamble, sumado a secuencias repetidas dentro del fragmento que en conjunto disminuirían la especificidad de la técnica. Con el fin de

prevenir estos eventos es recomendable realizar la reacción de Gibson assembly con fragmentos frescos, para así evitar la degradación del ADN.

Se utilizó los constructos CC y MIR para la transformación, estos poseían los módulos de expresión Kan-Skaro10 y Kan respectivamente. La integración se realizó en el gen *URA3*, gen que codifica para la orotidina 5' - fosfato descarboxilasa, enzima esencial en la ruta de síntesis uracilo y cuya ausencia genera auxotrofia por lo cual es comúnmente utilizado como marcador de selección. Esto permitió distinguir las transformantes que sustituyeron el gen *URA3* por selección negativa en medio mínimo (Figura 9).

La transformación de *S. cerevisiae* se realizó por electroporación, la selección se realizó en 3 pasos, el primero (Figura 9A) para la selección de transformantes, el Segundo (Figura 9B) para la eliminación de falsos positivos, colonias que presentan una resistencia transitoria a G418 sobreviven a una primera etapa de selección y un tercer paso permite la selección de transformantes y su genotipo, si se integraron o no sustituyendo el gen *URA3* (Figura 9 C, D).

Para la determinación de la concentración de selección se utilizaron placas con distintas concentraciones de G418. El menor número de colonias falsas positivo, que permite seleccionar colonias transformadas se observó a 300 µg/mL de G418 (Figura 9 A).

Utilizando las colonias transformadas con MIR, verificadas mediante PCR (Figura 10), se analizó la resistencia a G418 en medio líquido en donde se observa una diferencia en el crecimiento desde los 100 µg/mL, pero desde los 250 µg/mL de G418 ya no se observa crecimiento en la cepa WT (Figura 11). Por otro lado, en el crecimiento entre la cepa auxótrofa 69 MIR y la cepa protótrofa 70 MIR no se observan diferencias dentro del rango de antibiótico usado, 100 µg/mL - 700µg/mL, de G418 (Figura 11).

Luego de la obtención de los transformantes con el módulo CC que contiene el gen de resistencia y el módulo de expresión de SkAro10 se seleccionaron 19 cepas protrótofas (Anexo B), las cuales se crecieron en medio SD suplementado con aa por 4 días (Avalos et al., 2013) para la medición de isobutanol. El crecimiento se realizó en medio mínimo suplementado con aa, puesto que el medio complejo YPD presenta un pico de refracción con un tiempo de retención similar al del isobutanol, por lo que interfería en la cuantificación mediante HPLC.

Dentro de la producción de las distintas cepas se puede observar que las transformaciones con el módulo MIR generan una disminución en la producción de isobutanol, sin embargo, en las transformantes con el módulo CC se observan dos grandes grupos; el primero que se comportan de manera similar a WT en la producción de isobutanol pero resistentes a G418 (dentro de este grupo se encuentran 12 de las 19 colonias, Figura 12,13A) y el segundo, constituido por 7 colonias (Figura 12, 13B), que muestra un aumento significativo en la producción de isobutanol y que presentan resistencia a G418. La cepa WT presenta producción promedio de isobutanol de 8,6mg/L, el primer grupo 8,6 mg/L y el segundo grupo 13,6 mg/L (Figura 12). Por otro lado, al comparar el crecimiento de estas colonias se observa que exceptuando por la cepa 12 las cepas tienden a disminuir su crecimiento, además si comparamos el crecimiento entre los grupos anteriormente descritos se observa que el crecimiento tiende a ser menor en las cepas que más isobutanol producen (Figura 13B). Esto se podría explicar por la acumulación de isobutil aldehído, compuesto producido por la enzima SkAro10 y que presenta alta toxicidad para la célula.

El método de transformación empleado utiliza la maquinaria nativa de reparación del material genético de *S. cerevisiae*, permitiendo la integración en un sitio específico de un

fragmento (Figura 1), esta especificidad viene dada por las secuencias homólogas con el genoma (Hua et al., 1997), en ese caso se utilizó las secuencias UP y DOWN que flanquean el marco de lectura del gen *URA3* (Flagfeldt et al., 2009), lo que permite la integración por sustitución de los módulos de integración al haber un doble evento de recombinación en los sitios UP y DOWN (Figura 1B). Al transformar utilizando ADN lineal el doble evento de recombinación se ve favorecido puesto que si no ocurre se generan daños mayores en el ADN genómico (Orr-Weaver et al., 1983), sin embargo, se transformó utilizando ADN circular lo que permite que con un solo evento de recombinación se integre el plásmido completo del módulo de integración (Figura 1A), manteniendo la región de homología y existiendo la posibilidad de que se integre nuevamente. Al necesitar solo un sitio de homología para la integración del vector, promotores y terminadores utilizados en la construcción de los módulos de expresión se convierten en secuencias que permitirían la integración del plásmido (Zgaga et al., 2001), sumando así una serie de nuevos sitios de integración. Considerando estas variables que se ingresaron al transformar utilizando ADN circular es posible explicar por qué se obtuvo una sola colonia auxótrofa, puesto que la probabilidad de obtener un doble evento de recombinación se vería disminuido en gran manera. Además se explica la diferencia en la producción de isobutanol y de crecimientos entre las distintas colonias puesto que dependiendo del sitio de integración existen diferencias en los niveles de expresión (Flagfeldt et al., 2009) que pueden depender de la compactación de la cromatina o por secuencias regulatorias aledañas. Existe también la posibilidad del silenciamiento de algún gen que pudiese afectar la producción de isobutanol o el crecimiento de la célula. Otro de los factores que influyen en los fenotipos observados es el número de copias del plásmido que se integró en uno o más sitios del genoma que aumentarían la variabilidad entre las colonias transformadas. Dado que en este trabajo no se evaluaron estas

posibilidades de integración, se sugiere la caracterización de las cepas sobre productoras mediante PCR, secuenciación y Southern dot-blot cuantitativo para la determinación del número de inserciones y los sitios de integración (Semkiv et al., 2016) o la realización de nuevas transformaciones utilizando los módulos de integración linealizados

La producción de isobutanol alcanzada en este trabajo es de 19,4 mg/L en la cepa 15 CC, que en comparación a los 8,6 mg/L (Figura 8) de la cepa WT genera un aumento del 125,6% de la producción de isobutanol, superando al 80% de incremento reportado en Avalos et al., 2013 al transformar con el gen *aro10* de *S. cerevisiae* con destinación mitocondrial. Este mayor incremento podría atribuirse que la enzima SkAro10, presenta una mayor actividad por el α -cetoisovalerato (Stribny et al., 2016).

Son varios los factores que se podrían modificar para obtener un aumento en la producción de isobutanol. En primera instancia sería la destinación mitocondrial de la enzima ADH, puesto que, al no transformar con esta, se genera que parte de la ruta se realice fuera de la mitocondria y el paso final de la ruta dependa de la difusión del metabolito intermediario, isobutil-aldehído, un compuesto tóxico para la levadura que genera estrés y podría reducir el crecimiento y la producción de isobutanol. Por otro lado existen evidencias de que el crecimiento de *S. cerevisiae* en ausencia de aminoácidos podría generar un aumento en la producción de isobutanol, debido a que la ruta de Ehrlich utiliza metabolitos intermediarios en las síntesis de aminoácidos como la valina, y bajo estas condiciones el flujo de carbono de esta ruta se vería incrementado (Hammer y Avalos, 2017). Otra estrategia a utilizar es la sobreexpresión del resto de las enzimas de la ruta ILV1, ILV2 e ILV3 encargadas de catalizar las reacciones para la formación de α -cetoisovalerato desde piruvato (Figura 2) (Avalos et al., 2013) y la delección de rutas

que compitan por los flujos de carbono (Buijs et al., 2013). Uno de los puntos de importancia a solucionar cuando se busca la producción de isobutanol es el desequilibrio redox generado por el consumo de NADPH por la enzima *Ilv5* y de NADH por *Adh*, que generan un estrés a nivel celular disminuyendo el crecimiento y la producción (Bloem et al., 2016).

Finalmente la utilización de una cepa industrial, que tenga una mayor producción basal de isobutanol, mayor tolerancia a altas concentraciones de alcohol por la continua selección de crecimiento (presencia de bombas de eflujo para alcoholes o la presencia de chaperonas que podrían estabilizar las proteínas a mayor concentración de isobutanol) y una conformación de membrana que permita una mayor estabilidad en presencia de estos, llegando a una tolerancia de hasta 6% de isobutanol (Ghiaci et al., 2013; González-Ramos et al., 2013; Lam et al., 2014).

6 Conclusiones

En este estudio se ensamblaron efectivamente los módulos de expresión de *kan*, *LIAdhA^{RE1}* y *SkAro10* mediante la técnica de Gibson Assembly, se generó un vector que permite la integración genómica de los módulos *Kan* y *SkAro10* a través de las secuencias de recombinación UP y DOWN las cuales dan especificidad para la integración en el cromosoma V de *S. cerevisiae*. Con estos vectores se obtuvieron cepas transformantes auxótrofas y protótrofas de *S. cerevisiae* para el gen de resistencia *kan* que fueron capaces de crecer hasta 700µg/mL de G418. Se obtuvieron 7 colonias transformantes en las que se integró el módulo sin sustituir al gen *URA3* y que presentan un aumento en la producción de isobutanol, la cepa 15CC produjo 19,4 mg/L de isobutanol, lo que corresponde a un aumento de 125,6% con respecto a la cepa WT.

Se propone la identificación de nuevas cepas con una mayor producción basal de isobutanol, la integración de una enzima ADH con destinación mitocondrial y la sobreexpresión de las enzimas responsables de los intermediarios previos a KIVD.

7 Referencias

- Argueso, J.L., Carazzolle, M.F., Mieczkowski, P.A., Duarte, F.M., Netto, O.V.C., Missawa, S.K., Galzerani, F., Costa, G.G.L., Vidal, R.O., Noronha, M.F., et al. (2009). Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Res.* *19*, 2258–2270.
- Atsumi, S., Hanai, T., and Liao, J.C. (2008). Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature* *451*, 86–89.
- Avalos, J.L., Fink, G.R., and Stephanopoulos, G. (2013). Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols. *Nat. Biotechnol.* *31*, 335–341.
- Becerra, M., Cerdán, M.E., and González-Siso, M.I. (2015). Biobutanol from cheese whey. *Microb. Cell Fact.* *14*, 27.
- Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., and Camarasa, C. (2016). Metabolic Impact of Redox Cofactor Perturbations on the Formation of Aroma Compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* *82*, 174–183.
- Branduardi, P., de Ferra, F., Longo, V., and Porro, D. (2014). Microbial n-butanol production from Clostridia to non-Clostridial hosts. *Eng. Life Sci.* *14*, 16–26.
- Buijs, N.A., Siewers, V., and Nielsen, J. (2013). Advanced biofuel production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *17*, 480–488.
- Choi, Y.J., Lee, J., Jang, Y.-S., and Lee, S.Y. (2014). Metabolic Engineering of Microorganisms for the Production of Higher Alcohols. *MBio* *5*, 1–10.

Clomburg, J.M., Crumbley, A.M., and Gonzalez, R. (2017). Industrial biomanufacturing: The future of chemical production. *Science* (80-.). 355, aag0804.

Fetter, S. (2000). Energy 2050. *Bull. At. Sci.* 56, 28–38.

Flagfeldt, D., Siewers, V., Huang, L., and Nielsen, J. (2009). Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 26, 545–551.

Ghiaci, P., Norbeck, J., and Larsson, C. (2013). Physiological adaptations of *Saccharomyces cerevisiae* evolved for improved butanol tolerance. *Biotechnol. Biofuels* 6, 101.

Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., and Smith, H.O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343–345.

González-Ramos, D., Van Den Broek, M., Van Maris, A.J.A., Pronk, J.T., and Daran, J.M.G. (2013). Genome-scale analyses of butanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* reveal an essential role of protein degradation. *Biotechnol. Biofuels* 6, 48.

Gunyuzlu, P.L., Hollis, G.F., and Toyn, J.H. (2001). Plasmid construction by linker-assisted homologous recombination in yeast. *Biotechniques* 31, 1246–1250.

Hadfield, C., Jordan, B.E., Mount, R.C., Pretorius, G.H.J., and Burak, E. (1990). G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 18, 303–313.

Hammer, S.K., and Avalos, J.L. (2017). Uncovering the role of branched-chain amino acid transaminases in *Saccharomyces cerevisiae* isobutanol biosynthesis. *Metab. Eng.* *44*, 302–312.

Hazelwood, L.A., Daran, J.-M., van Maris, A.J.A., Pronk, J.T., and Dickinson, J.R. (2008). The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 3920–3920.

Higashide, W., Li, Y., Yang, Y., and Liao, J.C. (2011). Metabolic Engineering of *Clostridium cellulolyticum* for Production of Isobutanol from Cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 2727–2733.

Hua, S., Qiu, M., Chan, E., Zhu, L., and Luo, Y. (1997). Minimum Length of Sequence Homology Required for *In Vivo* Cloning by Homologous Recombination in Yeast. *Plasmid* *38*, 91–96.

Knoshaug, E.P., and Zhang, M. (2009). Butanol Tolerance in a Selection of Microorganisms. *Appl. Biochem. Biotechnol.* *153*, 13–20.

Kumar, M., and Gayen, K. (2011). Developments in biobutanol production: New insights. *Appl. Energy* *88*, 1999–2012.

Lacroute, F. (1968). Regulation of pyrimidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *95*, 824–832.

Lam, F.H., Ghaderi, A., Fink, G.R., and Stephanopoulos, G. (2014). Engineering alcohol tolerance in yeast. *Science* (80-.). *346*, 71–75.

Lan, E.I., and Liao, J.C. (2012). ATP drives direct photosynthetic production of 1-butanol in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 6018–6023.

Lee, R.A., and Lavoie, J.-M. (2013). From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Anim. Front.* 3, 6–11.

Li, S., Jia, X., and Wen, J. (2012). Improved 2-methyl-1-propanol production in an engineered *Bacillus subtilis* by constructing inducible pathways. *Biotechnol. Lett.* 34, 2253–2258.

Liu, H., Wang, G., and Zhang, J. (2013a). The Promising Fuel-Biobutanol. In *Liquid, Gaseous and Solid Biofuels - Conversion Techniques*, (InTech), p.

Liu, S., Qureshi, N., and Hughes, S.R. (2017). Progress and perspectives on improving butanol tolerance. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 51.

Liu, X., Bastian, S., Snow, C.D., Brustad, E.M., Saleski, T.E., Xu, J.-H., Meinhold, P., and Arnold, F.H. (2013b). Structure-guided engineering of *Lactococcus lactis* alcohol dehydrogenase LIAdhA for improved conversion of isobutyraldehyde to isobutanol. *J. Biotechnol.* 164, 188–195.

Lu, J., Brigham, C.J., Gai, C.S., and Sinskey, A.J. (2012). Studies on the production of branched-chain alcohols in engineered *Ralstonia eutropha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 283–297.

Lütke-Eversloh, T., and Bahl, H. (2011). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 634–647.

Ministerio de Energía - Gobierno de Chile (2015). Balance nacional de energía 2015. 184.

Nielsen, D.R., Leonard, E., Yoon, S.-H., Tseng, H.-C., Yuan, C., and Prather, K.L.J. (2009). Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria. *Metab. Eng.* 11, 262–273.

Orr-Weaver, T. L., & Szostak, J. W. (1983). Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(14), 4417-4421

Park, C.-H. (1996). Pervaporative butanol fermentation using a new bacterial strain. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 1, 1–8.

Pfromm, P.H., Amanor-Boadu, V., Nelson, R., Vadlani, P., and Madl, R. (2010). Bio-butanol vs. bio-ethanol: A technical and economic assessment for corn and switchgrass fermented by yeast or *Clostridium acetobutylicum*. *Biomass and Bioenergy* 34, 515–524.

Rajesh Kumar, B., and Saravanan, S. (2016). Use of higher alcohol biofuels in diesel engines: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 60, 84–115.

Regalbuto, C., Pennisi, M., Wigg, B., and Kyritsis, D. (2012). Experimental Investigation of Butanol Isomer Combustion in Spark Ignition Engines. pp. 612–626.

Semkiv, M. V., Dmytruk, K. V., & Sibirny, A. A. (2016). Development of a system for multicopy gene integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of microbiological methods*, 120, 44-49.

Shao, Z., Zhao, H., and Zhao, H. (2009). DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Res.* 37, e16–e16.

Shen, C.R., Lan, E.I., Dekishima, Y., Baez, A., Cho, K.M., and Liao, J.C. (2011). Driving Forces Enable High-Titer Anaerobic 1-Butanol Synthesis in *Escherichia coli*. *Appl.*

Environ. Microbiol. 77, 2905–2915.

Shi, S., Si, T., Liu, Z., Zhang, H., Ang, E.L., and Zhao, H. (2016). Metabolic engineering of a synergistic pathway for n-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. Sci. Rep. 6, 25675.

Smith, K.M., Cho, K.-M., and Liao, J.C. (2010). Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87, 1045–1055.

Stribny, J., Romagnoli, G., Pérez-Torrado, R., Daran, J.-M., and Querol, A. (2016). Characterisation of the broad substrate specificity 2-keto acid decarboxylase Aro10p of *Saccharomyces kudriavzevii* and its implication in aroma development. Microb. Cell Fact. 15, 51.

Trindade, W.R. da S., and Santos, R.G. dos (2017). Review on the characteristics of butanol, its production and use as fuel in internal combustion engines. Renew. Sustain. Energy Rev. 69, 642–651.

Weber, H., and Falbe, J. (1970). Oxo Synthesis Technology. In European and Japanese Chemical Industries Symposium, pp. 33–37.

Yu, M., Du, Y., Jiang, W., Chang, W.-L., Yang, S.-T., and Tang, I.-C. (2012). Effects of different replicons in conjugative plasmids on transformation efficiency, plasmid stability, gene expression and n-butanol biosynthesis in *Clostridium tyrobutyricum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93, 881–889.

Zgaga, Z., Gjuracic, K., Svetec, I.-K., Mitrikeski, P.T., and Gregoric, S. (2001). Plasmid integration in yeast: conceptions and misconceptions. Curr. Stud. Biotechnol. //, 135–142.

Anexo A Secuencias utilizadas

Nombre	Secuencia	Detalles
Módulo Kan	<p>ACTTCTCGTAGGAACAATTTCTGGGCCCTGCGTGTCTTCTGAGGTTTCATCTTTTACATTTGCTTCTGCTGGATAATTTTCA GAGGCAACAAGGAAAAATTAGATGGCAAAAAGTCGTCTTTCAAGGAAAAATCCCACCATCTTTGAGATCCCCTGTAACCTT ATTGGCAACTGAAAGAATGAAAAGGAGGAAAAATACAAAATATACTAGAACTGAAAAAAAAAAGTATAAATAGAGACGATAT ATGCCAATACTTCACAATGTTCTGAATCTATTCTTCATTTGCAGCTATTGTAAAATAATAAAACATCAAGAACAACAAGCTC AACTTGTCTTTTCTAAGAACAAGAATAAACACAAAAACAAAAAGTTTTTTTTAATTTTAAATCAAAAAATGAGCCATATTCAA CGGGAACGTCCTTGTCTGAGGCCGCGATTAAATTTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATG TCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAG CGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTCCGACCATCAAGCATTTT ATCCGTA CTCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAAAACAGCATTCAGGTATTAGAAGAATATCCTG ATTCAGGTGAAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGTTCATTTCGATTCCTGTTTGTAAATTGTCCTTTTAA CAGCGATCGCGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAG CGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAGCTTTTGCCATTCTCACCATTTCAGTCGTCACCTCATG GTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGA CCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAAATAT GGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAAACAAAATCGCTCTTAAATAT ATACCTAAAGAACATTAAGCTATATTATAAGCAAAGATACGTAATTTTGTCTATATTATTATACACATATCATATTTCTA TATTTTAAAGATTTGGTTATATAATGTACGTAATGCAAAGGAAATAAATTTTATACATTATTGAACAGCGTCCAAGTAATA CATTATGTGCACTAATAGTTTTAGCGTCGTGAAGACTTTATTGTGTCGCGAAAAGTAAAAATTTAAAAAATTAGAGCACCTTG AACTTGCGAAAAAGGTTCTCATCAACTGTTTAAAAGGAGGATATCAGGTCTATTTCTGACAAACAATATACAAATTTAGTT TCAAAGATGAATCAGTGCAGCAAGGACATAACTCATGAAGCCTCCAGTATACC</p>	<p>1-395 Promotor tHXT7p</p> <p>396-1211 Gen kan</p> <p>1212-1611 Terminador PGIt</p>
Módulo SkAro10	<p>GGGGCGTATACTTACATATAGTAGATGTCAAGCGTAGGCGCTTCCCCTGCCGGCTGTGAGGGCGCCATAACCAAGGTATCT ATAGACCGCAATCAGCAAACCTACCTCCGTACATTCATGTTGCACCCACACATTTATACACCAGACCGCGACAAATTACCC ATAAGGTTGTTTGTGACGGCGTCTACAAGAGAACGTGGGAACTTTTTAGGCTCACCAAAAAAGAAAAGAAAAATACGAGTT GCTGACAGAAGCCTCAAGAAAAAAAAAATCTTCTTCGACTATGCTGGAGGCAGAGATGATCGAGCCGGTAGTTAACTATAT ATAGCTAAATTTGGTTCATCACCCTCTTTTCTGGTGTGCTCCTTCTAGTGCTATTTCTGGCTTTTCTCTATTTTTTTTTTCTC CATTTTCTTTCTCTCTTTCTAATATATAAATCTCTTGCATTTTCTATTTTCTCTCTATCTATCTACTTGTTTATTTCC TTCAAGGTTTTTTTTTAAGGAGTACTTGTTTTTTAGAATATACGGTCAACGAACATAATTAACFAAACATGCTTAGTCTACG TCAATCCATAAGATTTCTTCAAACCAGCAACTAGAACGCTGTGTAGTAGTAGATACTTATTAACCTCCGCTGACTATAAACACC TTCGTGAACCAAAAAGAGCCACACTTAGTCTCCAATGAATTAGCTACTATCAGTTTCCGAGAATATATATTCAGGAGATTGT TATCAACGGGTACAAAATCAGTCTTTGGGGTACCCGGTGACTTCAATCTATCTTTGTTGGAGTACCTATATGCACCGTCCGT CGAATCCGACGGGTTGAAGTGGATAGGAACATGCAACGAATTGAACGCTGCTTATGCCGAGATGGTTATTCCAGGTACTCA AATAACATCGGCTGCCTGGTGACGACGTTCCGGGTCCGAGAATTGTCCGCTTTGAATGGTGTAGCTGGAAGCTTTGCAGAAA ATGTTAAAGTGCTACATATAGTAGGGGTAGCGAAAAGCATTGATAGTAGGTCAGACAATTTTAGAGACAGAAATATGCACCA CTTAGTCCCGAATTACAGGGGAGTAACTTCAAAGGACCAATCATAAGGTTTACCATGACATGGTCAAGGACCGTGTTCGG</p>	<p>1-560 Promotor TEF2p</p> <p>561-2558 Gen SkARO10</p> <p>561-635 Péptido señal CoxIV</p> <p>2537-2558 Cola de histidina</p>

	<p>TGCTCCGTCGCATATTTAGAGGATATAGAGACCGCGTGTGATCAAGTCGACAACGTCATCCGTGATATCTACAAGTACAGCA AACCGGATATATATTTGTACCAGCTGATTTTGC GGATATGTCTGTAACCTGCGAGAATCTTATTAATGTCCCCATATTTT TCAGCAGGACTGCATCACATACCCCTCTCAGATTCAGCTATTTGATATTTTAGACAGGATAACCTCATGGATGTACTCCTCT AAAACGCCGGCCATTCTGGGCGACGTCCTAACAGATCGTTACGGCGTAAGTGAGATCCTGAACAAGCTGATTTACGCTACCG GAATATGGAATTTTTCAACTGTCAATGGGTAAGAGCGTGATCGACGAGGCCAACCCCAAGTACATGGGCCAGTACAACGGCAA AGAAGGGCTGCGTCAAGTTTATGAACATTTGAAAAGCTGCGATCTGGTCTTCACTTCGGGGTCGACATTAATGAGATAAAT AATGGCATTACACCTTCACCTACAAGCCTAATGCGAAGATAATACAGTTCCACCCGAATTATATAAGGTTTGTGGACACCA AATACGGCCACGAGCAGATGTTTGAAGGGATTAACCTTTCGCGCCGTGTTGATGGAGTTGTATAAGGGGATAGACGTTTCACG TCTGTCATTGCAATACGACAGTGGTGTACGTCTATAACCAACGAGACTATGCAGTTAGAAGACCTACAAACGACCAGTCC AATAACATTACGCAGGTCCATTTGCAAAAAGGTGATGCCTAAATTTCTTTACCAGGGGATGTAGTGGTGTGCGAGACGGGT CTTTTCAATTTCTGTTAGGGATTTTGC GTTTCCGACCCAACAAAGTATATCAGCCAGGGTTTTTCTCTGAGTATTGGTAT GGCATTGCCCGCGGCCCTAGGAGTGGGTATAGCCATGCAGGACTTCCGAATGCTCATATTTCTGATGAGAACATCGGGGAG GGGTACAAAACCCAGACTGATCTTGTTCGAAGGTGATGGTGTGCTGCCAGATGACTATTCAGGAACTTAGCACCATATTGAAAT GCCATATAACCATCGACATCTTTATTTGGAACAACAACGGTTACACAATAGAAAGAGCGATCATGGGCCCCACGCGTGCCTA TAATGACGTCATGAGCTGGAATGGACAAAAGTTGTTAGAAGCCTTCGGAGATTTTGATCGTAAGCATACCAACTCCACAGTT ATTGAGTACCCGTCTAAGCTAGCTATGAAGCTAGAGGAATTGAAGTCTAGCAACACCAGGGATGGGATTGAGCTAGTAGAAG TAAAGTTGGGGGTGCTAGATTTCCCTGAACAGTTGAAATGCATGGTTGACGCCCGCTCTAAAGAGAAAACAAGAA GCACCA TCATCATCACTAAGATTAATATAATATATAAAAATATATCTTCTTTCTTTATATCTAGTGTATGTAAAATAAAT GATGACTACGGAAAGCTTTTTTATATGTTTCTTTTTCATTCTGAGCCACTTAAATTTCTGTGAATGTTCTTGTAAAGGGACGG TAGATTTACAAGTGATACAACAAAAAGCAAGGCGCTTTTCTAATAAAAAGAAGAAAAGCATTAAACAATTGAACACCTCTA TATCAACGAAGAATATTACTTTGTCTCTAAATCCTTGTAATAATGTGTACGATCTCTATATGGGTACTCATAAGTG TACCGA AGACTGCATTGAAAGTTTATGTTTTTCTACTGGAGGCGTCATTTTCGCGTTGAGAAGATGTTCTTATCCAAATTTCAACTGT TATATA</p>	<p>2559-2958 Terminador TPI1t</p>
Módulo LIAdhA ^{RE1}	<p>CATGCGACTGGGTGAGCATATGTTCCGCTGATGTGATGTGCAAGATAAAACAAGCAAGGCAGAACTAACTTCTTCTCATGT AATAAACACACCCCGCGTTTATTTACCTATCTCTAAACTTCAACACCTTATATCATAACTAATATTTCTTGAGATAAGCACA CTGCACCATACTTCTTAAAAACGTAGCTTCCAGTTTTTGGTGGTTCCGGCTTCTTCCCGATTCCGCCCGCTAAACGCA TATTTTGTGCTGGTGGCATTGCAAAAATGCATAACCTATGCATTTAAAAGATTATGTATGCTCTTCTGACTTTTCTGTT GATGAGGCTCGTGGAATAAATGAATAATTTATGAATTTGAGAACAATTTTGTGTTGTTACGGTATTTTACTATGGAATAATC AATCAATTGAGGATTTTATGCAAAATATCGTTTGAATATTTTCCGACCCCTTGGAGTACTTTTCTTATAATTGCATAATAT GTCCGCTGCCCTTTTCTGTTAGACGGTGTCTGATCTACTTGTCTATCGTTCAACACCACCTTATTTCTAACTATTTTTT TTTTAGCTCATTGAATCAGCTTATGGTATGGCACATTTTTGCATAAACCTAGCTGCTCCTGTTGAACATAGGAAAAAAA ATATATAACAAGGCTCTTTCACTCTCCTTGCAATCAGATTTGGGTTTGTTCCTTTATTTTTCATATTTCTTGTATATTTCC TTTTCTCAATTATTATTTTCTACTCATAAACCACGCAAAATAACACAGTCAAATCAATCAA ATGCTTAGTCTACGTCAATC CATAAGATTCTTCAAACCAGCAACTAGAACGCTGTGTAGTAGTAGATACTTATTAAAAGCCGCGTCTGTCCTCACAATCCC GATGGCTACGCTGACCTTGTGAAAAAGAATTGAGGGCGATAAAACCAACGAGGCTCTACTGGATATGGAGTACTGCGGGG TCTGTACACAGACTTGCACGTTGCCGCGGCGACTTTGAAAATAAAGCTGGCACTGTTTTGGGACACGAGGGGATAGGCAT CGTGAAGAAAATAGGGGCGGACGTGAGTTCCCTTACAAGTGGGAGACAGGGTCTCAGTGGCTTGGTCTTTCGAAGGATGCGGG CATGCGAATACTGTGTCTCTGGTAAACGAGACTTTCTGTGCTGAAGTAAAAATGCGGGTTACAGCGTTGATGGCGGCATGG CGGAGGAGGCGATTGTTGTGGCCGATTACGCTGTTAAGGTGCCAGACGGGTTGGACCCTATAGAGGCATCTAGTATAACCTG</p>	<p>1-800 Promotor PDC1p</p> <p>801-1919 Gen LIADHA^{RE1}</p> <p>801-875 Péptido señal CoxIV</p> <p>1899-1919 Cola de histidina</p> <p>1920-2319 Terminador TDH2t</p>

	<p>TGCTGGAGTGACTACGTATAAAGCAATTAAGGTGTCCGGCGTTAAGCCGGGAGATTGGCAAGTCATCTTTGGTGC GGGTGGG TTGGGCAATTTAGCCATACAGTACGCTAAGAACGTTTTTCGGCGCGAAGGTGATTGCAGTGGATATTAATCAGGATAAGTTAA ACTTAGCGAAGAAAATCGGTGCTGACGTAACGATAAACAGCGCGACGTTAATCCAGTGGACGAAATCAAGAAGATAACTGG CGGGTTAGGCGTGCAATCAGCCATTGTTTGCGCCGTAGCGAGGATTGCATTTGAGCAGGCTGTGGCCTCATTA AAAACCCATG GGCAAAATGGTTGCGGTAGCCGTC C CCAACACGGAAATGACTTTATCAGTTCCACCGTTGTCTTTGACGGCGTGGAGGTTG CGGGTAGCCTAGTGGGAACGAGATTGGATCTGGCGGAGGCATTTAGTTCCGGTGCAGAAGGGAAGGTCAAACCCATAGTCGC TACACGTAAGTTGGAGGAGATCAATGACATAATTGACGAGATGAAAGCAGGTAAGATAGAGGGAAGGATGGTCATAGACTTT ACTAAGCTGGAAACCCATCATCATCACTAAATTTAACTCCTAAGTTACTTTAATGATTTAGTTTTATTATTAATAAT TCATGCTCATGACATCTCATATACACGTTTATAAAACTTAAATAGATTGAAAATGTATTAAGATTCCTCAGGGATTTCGATT TTTTTGGAAAGTTTTTGTTTTTTTTTTCCTTGAGATGCTGTAGTATTTGGGAACAATTATACAATCGAAAGATATATGCTTACA TTCGACCGTTTTTAGCCGTGATCATTATCCTATAGTAACATAACCTGAAGCATAACTGACACTACTATCATCAATACTTTGTCA CATGAGAACTCTGTGAATAATTAGGCCACTGAAATTTGATGCCTGAAGGACCGGCATCACGGATTTTCGATAAAGCACTTAG TATCACACTAATTGGCTTTTTCGC</p>	
UP	<p>AAACGACGTTGAAATTGAGGCTACTGCGCCAATTGATGACAATACAGACGATGATAACAAACCGAAGTTATCTGATGTAGAA AAGGATTAAGATGCTAAGAGATAGTGATGATATTTATAAATAATGTAATTCATATATGTTAATTACCTTTTTTGGCGAGG CATATTTATGGTGAAGGATAAGTTTTGACCATCAAAGAAGGTTAATGTGGCTGTGGTTTTCAGGGTCCATAAAGCTTTTCAAT TCATCTTTTTTTTTTTTTGTTCTTTTTTTTATTCCGGTTTTCTTTGAAATTTTTTTGATTCGGTAATCTCCGAGCAGAAGGAA GAACGAAGGAAGGAGCACAGACTTAGATTGGTATATATACGCATATGTGGTGTGAAGAAACATGAAATTGCCAGTATTCT TAACCAACTGCACAGAACAAAACCTGCAGGAAACGAAGATAAATCATGTGCAAAGCTACATATAAGGAACGTGCTGCTAC TCATCCTAGTCC</p>	<p>Cromosoma V S. <i>cerevisiae</i> Secuencia de homología para la integración en marco de lectura de gen <i>URA3</i>(Flagfeldt et al., 2009)</p>
DOWN	<p>GGGAAGCATATTTGAGAAGATGCGGCCAGCAAAACTAAAAACTGTATTATAAGTAAATGCATGTATACTAAACTCACAAAT TAGAGCTTCAATTTAATTATATCAGTTATTACCCGGGAATCTCGGTGCTAATGATTTCTATAATGACGAAAAAAAAAAAAAT GGAAAGAAAAAGCTTCATGGCCTTTATAAAAAGGAACTATCCAATACCTCGCCAGAACCAAGTAACAGTATTTTACGGGGCA CAATCAAGAACAATAAGACAGGACTGTAAAGATGGACGCATTGAACTCCAAAGAACAACAAGAGTCCAAAAAGTAGTGGGA ACAAAAGCAAATGAAGGATTTTCATGCGTTTGTACTCTAATCTGGTAGAAAGATGTTTACAGACTGTGTCAATGACTTACA ACATCAAAGCTAACCAATAAGGAACAAACATGCATCATGAAGTGCTCAGAAAAGTTCTTGAAGCATAGCGAACGTGTAGGGC AGCGTTTCC</p>	<p>Cromosoma V S. <i>cerevisiae</i> Secuencia de homología para la integración en marco de lectura de gen <i>URA3</i>(Flagfeldt et al., 2009)</p>

Anexo B Producción específica y total de isobutanol

Nº	Cepa	mg/L	Desviación estándar	mg/(L·DO ₆₀₀)	Desviación estándar	DO ₆₀₀ /DO _{600WT}	Desviación estándar
1	WT	8,6	±3,28	35,7	±12,40	1,0	±0,11
2	69 MIR	3,0	±0,60	28,2	±7,40	0,2	±0,04
3	70 MIR	7,1	±1,16	31,1	±3,79	1,0	±0,05
4	1CC	10,3	±6,18	46,9	±16,96	0,8	±0,27
5	2CC	10,1	±5,75	49,0	±28,73	0,8	±0,09
6	3CC	6,6	±3,53	34,8	±15,14	0,7	±0,16
7	4CC	7,6	±4,82	37,2	±20,70	0,8	±0,09
8	5CC	9,4	±4,51	48,2	±29,28	0,8	±0,12
9	6CC	10,8	±2,43	55,6	±13,55	0,7	±0,04
10	10CC	10,8	±3,57	48,6	±20,98	1,0	±0,28
11	12CC	11,7	±1,95	44,9	±8,98	1,2	±0,24
12	15CC	16,1	±2,86	85,2	±11,41	0,7	±0,06
13	16CC	14,6	±4,31	68,2	±19,87	0,9	±0,11
14	17CC	5,9	±1,98	38,2	±15,20	0,5	±0,08
15	18CC	14,5	±1,99	82,7	±17,16	0,7	±0,19
16	19CC	8,5	±2,25	47,8	±15,95	0,7	±0,09
17	20CC	9,3	±4,03	48,0	±21,30	0,7	±0,09
18	21CC	5,7	±1,13	36,1	±9,11	0,5	±0,05
19	22CC	13,4	±1,26	70,5	±16,80	0,8	±0,18
20	23CC	14,0	±1,56	77,4	±7,12	0,7	±0,02
21	24CC	12,5	±3,02	83,5	±19,65	0,5	±0,05
22	25CC	12,4	±3,21	73,6	±24,88	0,6	±0,13